

**Untersuchungen zur Synthese, biologischen Aktivität
und Stabilität von Paullonen und verwandten
d-anellierten [1]Benzazepinonen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
Dissertation

von
Simone Kohfeld
aus Reinbek

1. Referent:	Prof. Dr. C. Kunick
2. Referent:	PD Dr. K. Baumann
eingereicht am:	31.07.2006
mündliche Prüfung (Disputation) am:	09.10.2006

2006

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch Prof. Dr. C. Kunick, im folgenden Beitrag vorab veröffentlicht:

Tagungsbeitrag:

S. Kohfeld, S. Schmitt, L. Meijer, C. Kunick: Structure-activity relationships for inhibition of mitochondrial malate dehydrogenase by paullones. (Poster) DPhG Jahrestagung 2004 vom 6. bis zum 9. Oktober in Regensburg.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von November 2002 bis Dezember 2003 am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg und in der Zeit von Januar 2004 bis Juli 2006 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Braunschweig unter der Anregung und Anleitung von

Herrn Prof. Dr. C. Kunick,

dem ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, seine vorbildliche engagierte Betreuung und seine Unterstützung sehr herzlich danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt auch

Herrn PD Dr. K. Baumann

für die Übernahme des Korreferats.

Wer fertig ist, dem ist nichts recht zu machen; ein Werdender wird immer dankbar sein.

Goethe, Faust

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen, chemischen Kürzel und Symbole	I-VIII
1 Einleitung	1
1.1 Funktion der Malatdehydrogenase im Stoffwechsel	1
1.2 Malatdehydrogenase als potentielle Zielstruktur therapeutischer Wirkstoffe	11
1.3 Hemmstoffe der Malatdehydrogenase	13
1.3.1 Chinoline	13
1.3.2 E7070	17
1.3.3 Paullone	18
2 Problemstellung: <i>d</i>-anellierte [1]Benzazepin-2-one als Hemmstoffe der Malatdehydrogenase	22
3 Synthesen	29
3.1 Synthese des 4-[(Dimethylamino)methyliden]- 3,4-dihydro-1 <i>H</i> -[1]benzazepin-2,5-dions	29
3.2 Synthese der 1-Aryl-4,6-dihydropyrazolo[4,3- <i>d</i>]- [1]benzazepin-5(1 <i>H</i>)-one	33
3.3 Synthese der 2-Anilino-5,7-dihydro-6 <i>H</i> -pyrimido- [5,4- <i>d</i>][1]benzazepin-6-one	51

4	Biologische Aktivität	58
4.1	Malatdehydrogenase-inhibitorische Aktivität	58
4.1.1	Messprinzip	58
4.1.2	Überprüfung relevanter Messparameter	61
4.1.3	Testung der Paullone	88
4.1.4	Überprüfung der Kinetik	97
4.1.5	Testung der Paullon-Strukturanaloga	101
4.2	Antiproliferative Aktivität der 1-Aryl-4,6-dihydro-pyrazolo[4,3- <i>d</i>][1]benzazepin-5(1 <i>H</i>)-one	103
4.2.1	Testung der in vitro Antitumoraktivität	103
4.2.2	Testung der Proteinkinase-inhibitorischen Aktivität	110
4.3	Kinaseinhibition durch 2-Anilino-5,7-dihydro-6 <i>H</i> -pyrimido[5,4- <i>d</i>][1]benzazepin-6-one	113
4.3.1	Funktion einzelner Proteinkinasen in der Tumorgenese	114
4.3.2	VEGFR-Inhibition durch 2-Anilino-5,7-dihydro-6 <i>H</i> -pyrimido[5,4- <i>d</i>][1]benzazepin-6-one	126
4.3.3	Struktur-Aktivitätsbeziehungen für die Kinase-Inhibition durch Pyrimidobenzazepinone 9	128
4.3.4	Ergebnisse des zellulären Assays mit den Pyrimidobenzazepinonen	131
5	Stabilitätsuntersuchung mit Kenpaullon	135
6	Zusammenfassung	147
7	Summary	150

8	Experimenteller Teil	153
8.1	Allgemeines	153
8.2	Synthese/Analytische Daten	157
	Anhang zu Kapitel 8.2	239
8.3	Biologische Daten	241
8.3.1	Malatdehydrogenase-Testung	241
8.3.2	In vitro Tumorzelllinien-Testung des NCI	255
8.3.3	Proteinkinase-Assays (ProQinase)	258
9	Literaturverzeichnis	270
	Anhang zu Kapitel 9	292

Verzeichnis der Abkürzungen, chemischen Kürzel und Symbole

a	Koordinatenabschnitt
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
ABL	Ableson ProteinTyrosine Kinase
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACN	Acetonitril
AKT1	AKT8 Virus Oncogene Cellular Homolog 1
Ang	Angiopoietin
Arg	Arginin
ARK5	AMP-activated Protein Kinase-related Kinase
Asp	Asparagin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AU	Absorptionseinheit
b	Steigung
Bcr	Breakpoint Cluster Region
ber.	berechnet
BRAF	v-RAF Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cc.	konzentriert
CDCl ₃	Deuterochloroform
CDK	Cyclin-dependent Kinase

c-Fms	Formerly McDonough Feline Sarcoma Viral (v-Fms) Oncogene Homolog
CHO	Chinese Hamster Ovary
Cis-Pt	Cis-Platin
CK	Casein Kinase
cKIT	v-KIT Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarcoma Viral Oncogene Homolog
cMDH	cytosolische Malatdehydrogenase
CML	chronisch-myeloische Leukämie
CO ₂	Kohlendioxid
COT	Cancer Osaka Thyroid Oncogene
COX	Cyclooxygenase
CRC	kolorektales Karzinom
CRH ₁ -R	Corticotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor
Cyc	Cyclin
d	Tag oder Dublett
Δ	Betrag
δ	chemische Verschiebung
d. h.	das heißt
DAD	Dioden Array Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
DMF	Dimethylformamid
DMFDMA	Dimethylformamiddimethylacetal
[D ₆]DMSO	Hexadeuterodimethylsulfoxid
DMSO	Dimethylsulfoxid

DS ²	Differenz der Abweichungsvarianzen
E	Empfindlichkeit
ϵ	Absorptionskoeffizient
E. coli	Escherichia coli
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF-R	Epidermal Growth Factor Receptor
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EndoR	endoreduplizierende Zellen
EphB4	Ephrin-Rezeptor B4
eq.	Äquivalent
ERBB2	v-ERBB2 Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2
ESI	Elektrospray-Ionisation
eV	Elektronenvolt
F	Freiheitsgrad
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FADH ₂	Flavinadenindinucleotid, reduzierte Form
FAK	Focal Adhesion Kinase
FGFR1	Fibroblast Growth Factor Receptor 1
FLT3	FMS-like Tyrosine Kinase
FT	Fourier-Transformation
G ₀ -Phase	Ruhephase im Zellzyklus
gef.	gefunden
GI ₅₀	Growth Inhibition 50%
GIST	gastrointestinale Stromatumore
g _o	obere Grenze

GSK-3	Glycogen Synthase Kinase-3
g_u	untere Grenze
h	Stunde
H^+	Proton
H_2	Wasserstoff
H_2CN_2	Diazomethan
H_2N-CN	Cyanamid
H_2O	Wasser
H_2SO_4	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
His	Histidin
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HNO_3	Salpetersäure
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
HUE/HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelium/Humane Umbilikalvenenendothelzellen
Hz	Hertz
IC_{50}	Inhibitory Concentration 50%
IGF1-R	Type-1 Insulin-like Growth Factor Receptor
IKK	I κ B-Kinase-Komplex
IKK2	I κ B-Kinase 2 (inhibitorische κ B-Kinase 2)
INS-R	Insulin-Rezeptor
IR	Infrarot
J	Kopplungskonstante
k. A.	keine Angabe

Kap.	Kapitel
KBr	Kaliumbromid
KH	Kaliumhydrid
K_i	Dissotiationskonstante
K_m	Michaelis-Konstante
Konz.	Konzentration
konz.	konzentriert
K-R	Aurora B Kinase-Mutant
L	Liter
L. mexicana	Leishmania mexicana
Lit.	Literatur
\log_{10}	dekadischer Logarithmus
L-PAM	Melphalan
M	Molar
m	Multiplett
m/z	Masse pro Ladungseinheit
Max	größter Wert
MDH	Malatdehydrogenase
MEF	Murine Embryonic Fibroblasts
+M-Effekt	positiver mesomerer Effekt
MET	MET Proto-Oncogene (Synonym: HGFR: Hepa- tocyte Growth Factor Receptor)
MG_MID	Meangraph Midpoint
Min	kleinster Wert
min	Minute
mMDH	mitochondriale Malatdehydrogenase
MS	Massenspektroskopie

MTX	Methotrexat
MW	Mikrowelle
N	Anzahl
N ₂	Stickstoff
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid
NADH+H ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid, reduzierte Form
NaOH	Natriumhydroxid
NCI	National Cancer Institute
NFκB	Nukleärer Faktor κB, Transkriptionsfaktor
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer = Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
O ₂	elementarer Sauerstoff
p56lck	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase LCK
PAK4	p21-activated Protein Kinase 4
PCC	Pearson Correlation Coefficient
Pd/C	Paladium/Kohle
PDGFR	Platelet-derived Growth Factor Receptor
PDK1	3'-Phosphoinositide-dependent Kinase 1
PG	Prüfgröße
pIC ₅₀	dekadischer Logarithmus des IC ₅₀ -Wertes
PLK1	Polo-like Kinase 1
ppm	parts per million
proz.	prozentig
PTK	Protein-Tyrosinkinase
PW	Prüfwert

q	Quartett
quart.	quartär
quint	Quintett
r	Korrelationskoeffizient
R	Spannweite (range)
R^2	Bestimmtheitsmaß
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
s	Standardabweichung
s	Singulett
s.	siehe
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SAK	Synonym für PLK4 (Polo-like Kinase 4)
SCF	Stem Cell Factor
Schmp.	Schmelzpunkt
sMDH	Soluble Malate Dehydrogenase
SOCl_2	Thionylchlorid
sog.	sogenannte
SRC	Rous Sarcoma Virus Transforming Oncogene
s_{rel}	relative Standardabweichung
s_{x0}	Verfahrensstandardabweichung
s_y	Reststandardabweichung
t	Triplett
tert.	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
TIE2 (TEK)	Endothelium-specific Receptor Tyrosine Kinase 2

t_m	Totzeit
TMS	Tetramethylsilan
Trizma [®]	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
t_s	Nettoretentionszeit
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
v. a.	vor allem
VB	Vertrauensbereich
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
V_k	Variationskoeffizient
V_{k0}	Verfahrensvariationskoeffizient
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit
W	Watt
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
\bar{x}	Mittelwert

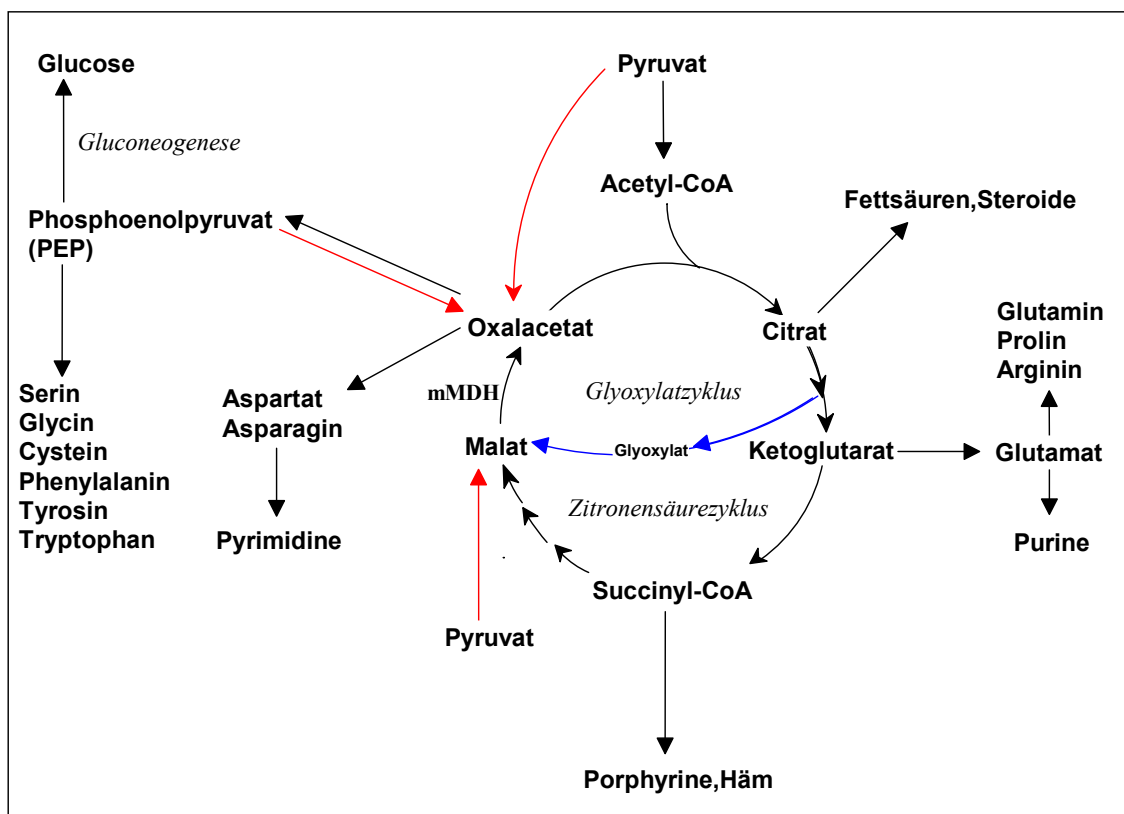
1 Einleitung

1.1 Funktion der Malatdehydrogenase im Stoffwechsel

Die Malatdehydrogenase (MDH) ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, das mit seiner Funktion im Zitronensäurezyklus eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel spielt. Beim Abbau von organischen Brennstoffmolekülen wie Glucose, Fettsäuren und einigen Aminosäuren entstehen C₂-Fragmente, die in Form von Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) in den Zitronensäurezyklus eingespeist werden, um dort enzymatisch zu CO₂ oxidiert zu werden. Die bei der Oxidation entstehenden Reduktionsäquivalente NADH+H⁺ und FADH₂ geben anschließend Protonen und Elektronen an die Atmungskette ab. Die mitochondriale Atmungskette besteht aus einer Reihe von Elektronen-Carriern, meist integralen Membranproteinen, die diese Elektronen aufnehmen und weiterleiten können. Am Ende der Kette steht die Reduktion von O₂ zu H₂O, so dass bei der oxidativen Phosphorylierung zwei Elektronen von NADH+H⁺ über die Atmungskette an elementaren Sauerstoff abgegeben werden. Die exergonische Reaktion der Sauerstoffreduktion liefert die Energie für die Bildung von ATP, das im Organismus einen wichtigen Energiespeicher darstellt. Da bei der Bildung von ATP Sauerstoff verbraucht wird, spricht man auch von Zellatmung. Neben diesen energieliefernden Prozessen gehen weitere essentielle Stoffwechselprozesse vom Zitronensäurezyklus aus.

Hierzu zählen u.a. die Gluconeogenese, der Harnstoffzyklus, der Glyoxylatzyklus und die β -Oxidation von Fettsäuren. Desweiteren stellt der Zitronensäurezyklus seine Zwischenprodukte als Biosynthesevorstufen für eine Vielzahl von Verbindungen zur Verfügung (siehe Abbildung 1-1).¹

Abbildung 1-1: Der Zitronensäurezyklus und die von ihm ausgehenden Biosynthesewege und Stoffwechselprozesse.

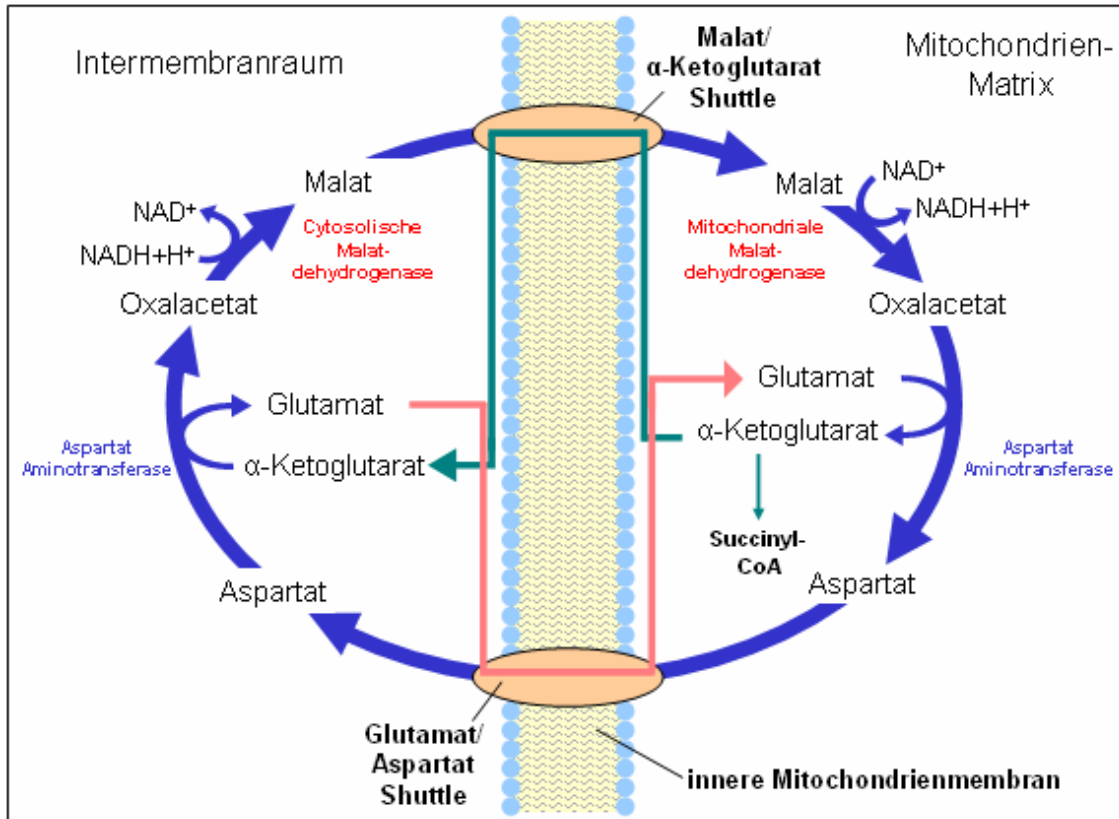


Die roten Pfeile zeigen anaplerotische Reaktionen, die knapp gewordene Zwischenprodukte des Zitronensäurezyklus wieder auffüllen. Die blauen Pfeile deuten den Glyoxylatzyklus an, der bei Pflanzen, bestimmten Wirbellosen und bei manchen Mikroorganismen (z.B. *E. coli*) vorkommt. (modifiziert nach Lehninger/ Nelson/ Cox¹)

Im Gegensatz zu den anderen energieliefernden Prozessen läuft die Glycolyse im Cytosol ab. Die dort entstandenen Reduktionsäquivalente müssen in die Mitochondrienmatrix eingebracht werden. Mitochondrien besitzen zwei Membranen. Die äußere Mitochondrienmembran ist für kleinere Moleküle ($M < 5000$) permeabel. Die innere Mitochondrienmembran jedoch ist für die meisten Moleküle ebenso wie für Protonen (H^+) undurchlässig. Nur Verbindungen, für die spezielle Transportproteine und -systeme vorhanden sind, können die Mitochondrienmembran passieren.

Eines dieser Transportsysteme stellt das Malat-Aspartat-Shuttlesystem (Abbildung 1-2) dar. Die Reduktionsäquivalente von cytosolischem $NADH+H^+$ werden auf Oxalacetat übertragen, das dabei in Malat umgewandelt wird. Diese Reaktion wird von cytosolischer Malatdehydrogenase (cMDH) katalysiert. Malat kann die innere Mitochondrienmembran durch den Malat- α -Ketoglutarat-Shuttle passieren. In der Mitochondrienmatrix wird Malat durch mitochondriale MDH (mMDH) wieder zu Oxalacetat oxidiert, im Gegenzug wird NAD^+ zu $NADH+H^+$ reduziert. Das gebildete sog. Matrix-NADH kann die ursprünglich aus dem Cytosol stammenden Reduktionsäquivalente in die Atmungskette einbringen. Da das Oxalacetat die innere Mitochondrienmembran wiederum nicht passieren kann, muss es zu Aspartat transaminiert werden, welches die Mitochondrienmatrix über den Glutamat-Aspartat-Transporter verlassen kann. Im Cytosol wird Oxalacetat regeneriert, wodurch der Zyklus beendet wird.²

Abbildung 1-2: Das Malat-Aspartatshuttlesystem und die Malatdehydrogenase als Schlüsselenzym zur Bildung des Matrix-NADH.



Über das Malat-Aspartat-Shuttlesystem können aus dem Cytosol stammende Reduktionsäquivalente in die Mitochondrienmatrix eingebracht, der Atmungskette zugeführt und somit für die Energiegewinnung genutzt werden.
(modifiziert nach Lehninger/ Nelson/ Cox²)

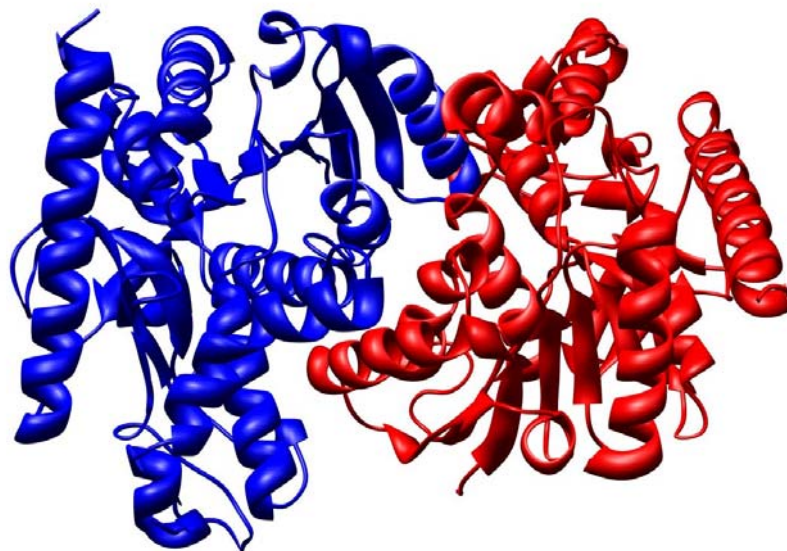
Die Malatdehydrogenase konnte in mehreren Isoformen identifiziert werden. Man unterscheidet diese Isoformen nach ihrer Lokalisation. In eukaryontischen Organismen konnte MDH in verschiedenen Zellkompartimenten wie in Glyoxysomen, Peroxisomen, Mitochondrien, Chloroplasten und im Cytosol gefunden werden, wobei lediglich die cytosolische und die mitochondriale Isoform in menschlichen Zellen vorkommen. Außerdem wurde in Escherichia

coli (*E. coli*) eine Form der MDH entdeckt, die eine große Ähnlichkeit zu mitochondrialer MDH (mMDH) besitzt. Alle MDH sind NAD-abhängig mit Ausnahme der chloroplastischen MDH, die NADP als Coenzym benötigt und daher auch als NADP-abhängige MDH (NADP-MDH) bezeichnet wird. Die genetische Codierung dieser Isoenzyme befindet sich auf Genen des Zellkerns, daher findet deren Synthese im Cytosol statt; die Einschleusung in das jeweilige Zellkompartiment erfolgt später. So verbleibt die cytosolische MDH nach Acetylierung des *N*-terminalen Endes im Cytosol. Für die mitochondriale MDH wird dagegen zunächst eine mit einem verlängerten *N*-terminalen Ende ausgestattete Vorstufe gebildet, die dann in die Mitochondrien-Matrix eingeschleust wird und erst dort ihre voll entwickelte Form annimmt.³⁻⁵

Die Primärstrukturen der verschiedenen MDH-Isoformen zeigen, abgesehen von entscheidenden Positionen für die Katalyse, Cofaktor-Bindungsstelle und Schnittstellen der Untereinheiten, wenig Ähnlichkeit. Vergleicht man beispielsweise die Primärstruktur der cMDH mit der Primärstruktur der mMDH, lässt sich lediglich eine Sequenz-Identität von etwa 20-25% finden. Die cMDH besteht aus 332 Aminosäuren, von denen 41 basische und 43 saure Reste tragen. Bei der mMDH liegen 33 basische und 29 saure Gruppen bei insgesamt 314 Aminosäuren vor. Infolgedessen zeichnet sich die cMDH als acidere und polarere MDH aus, man spricht auch von der löslichen Malatdehydrogenase (sMDH, engl.: soluble MDH).^{6, 7} Trotz der sequenziellen Unterschiede sind die dreidimensionalen Strukturen der MDH-Isoformen sehr ähnlich. Sowohl cMDH als auch mMDH bilden multimere Enzyme, jeweils bestehend aus identischen Untereinheiten mit Molekulargewichten von je 35 bzw. 33 kDa, die

zu Dimeren oder Tetrameren organisiert sind. Die cMDH bildet ein nahezu zwei-Achsen-symmetrisches Dimer (Abbildung 1-3). Die mMDH liegt in kristalliner Form als Tetramer (Abbildung 1-4) bestehend aus vier identischen Untereinheiten vor, während sie in Lösung lediglich als Dimer vorkommt.

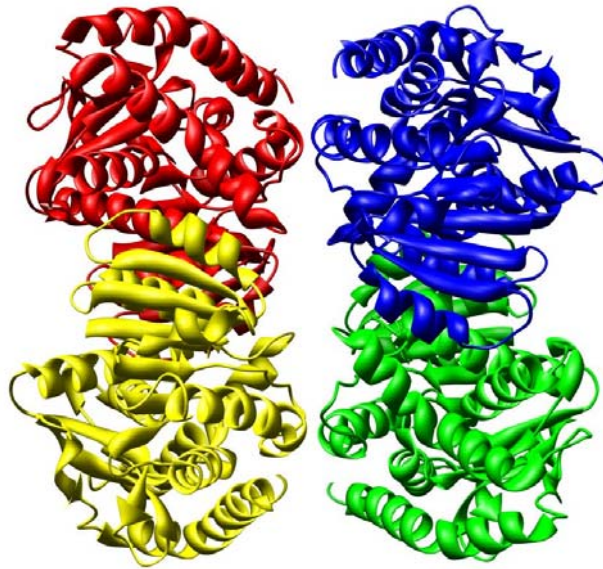
Abbildung 1-3: Struktur der cytosolischen MDH.



Die cytosolische MDH bildet sowohl in Lösung als auch in kristalliner Form Dimere. Die einzelnen Monomere sind verschiedenfarbig dargestellt. Die Abbildung wurde von Dr. Lutz Preu (Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig) mit dem Programm *Chimera* erstellt.⁸

Die für diese Abbildung zugrundeliegende Röntgenstruktur der cMDH wurde unter dem Identifikationscode *4MDH* der Protein Data Bank at the Brookhaven National Laboratory entnommen.⁷

Abbildung 1-4: Struktur der mitochondrialen MDH.

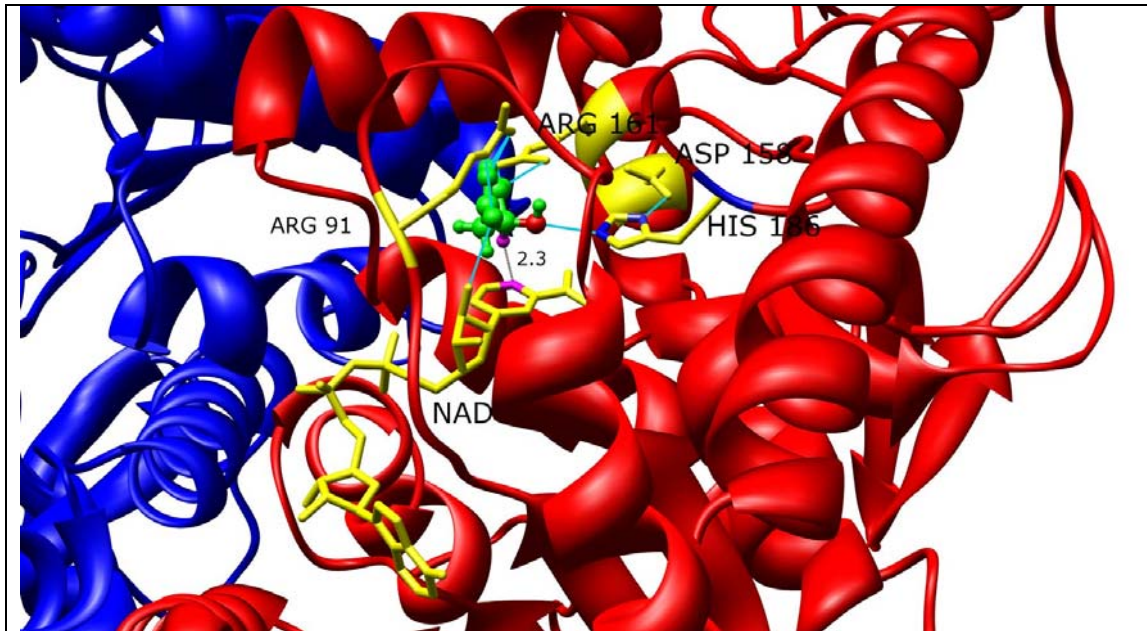


Die mitochondriale MDH bildet in Lösung Dimere, in kristalliner Form jedoch Tetramere wie hier abgebildet. Die einzelnen Monomere sind verschiedenfarbig dargestellt. Die Abbildung wurde von Dr. Lutz Preu (Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig) mit dem Programm *Chimera* erstellt.⁸

Die für diese Abbildung zugrundeliegende Röntgenstruktur der mMDH wurde unter dem Identifikationscode *1MLD* der Protein Data Bank at the Brookhaven National Laboratory entnommen.⁵

Die Untereinheiten beider MDH-Isoformen lassen sich in zwei Domänen gliedern, dabei bildet die N-terminale Hälfte die Coenzym-bindende Domäne (Abbildung 1-5), in der sechs parallel angeordnete β -Strukturen von vier α -Helices umgeben werden, während die C-terminale Hälfte die katalytische Domäne, oder auch Substrat-bindende Domäne, darstellt. In der katalytischen Domäne werden zweimal drei parallel angeordnete β -Strukturen von insgesamt fünf α -Helices durchzogen.

Abbildung 1-5: NAD⁺ und L-Malat (grün, ball-and-stick-Darstellung) in der Bindungstasche der cytosolischen MDH.



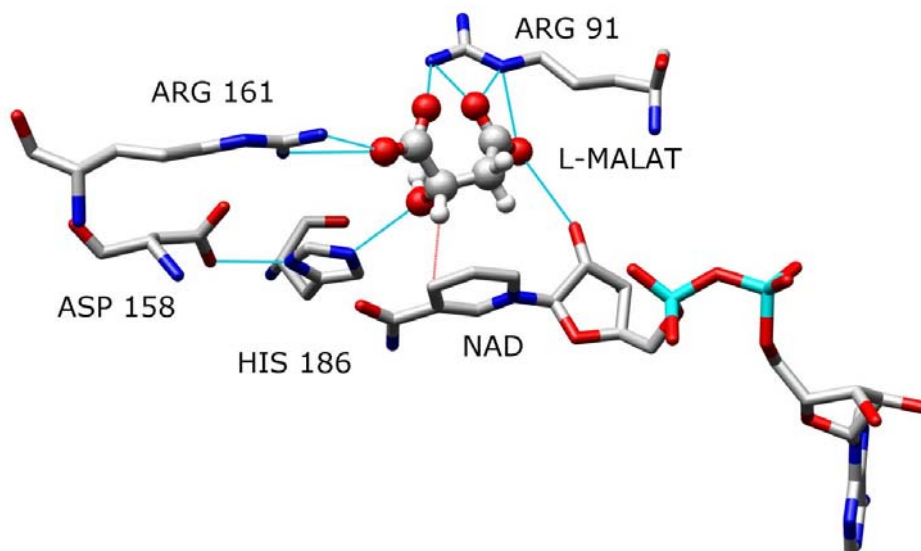
NAD⁺ liegt in der Coenzym-bindenden Domäne der MDH, welche die N-terminale Hälfte des Enzyms ausmacht. Das L-Malat liegt angrenzend in der Substrat-bindenden Domäne, der C-terminalen Hälfte des Enzyms.

Die Abbildung wurde mit dem Programm *Chimera* erstellt.⁸ Die für diese Abbildung zugrundeliegende Röntgenstruktur der cMDH wurde unter dem Identifikationscode *5MDH* der Protein Data Bank at the Brookhaven National Laboratory entnommen und von Dr. Lutz Preu (Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig) modifiziert. Das Malat wurde anstelle des in der Röntgenstruktur gebundenen 2-Ketomalonats mit dem Programm *ArgusLab* eingedockt.^{7, 9} Die blauen Linien stellen die Wasserstoffbrückenbindungen dar.

Eine entscheidende Rolle bei dem Wasserstofftransfer von Substrat und NAD⁺ spielt das sog. Histidin-Asparagin-Paar. Für das Beispiel cMDH handelt es sich um His-186 und Asp-158, die über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Carboxylgruppe des Asparagins und dem Imidazolring des Histidins miteinander verbunden sind. Eine weitere wichtige Bedeutung haben das Arg-161 und das Arg-91 für die Substratbindung im aktiven Zentrum der

cMDH. Die Guanidinstruktur des Arginins-161 fixiert das Substrat über Wasserstoffbrückenbindungen zum C1-Carboxylat, das Arginin-91 bildet mehrere Wasserstoffbrückenbindungen zum C4-Carboxylat, aber auch wie Arg-161 zum C1-Carboxylat. Diese Zusammenhänge sind schematisch in Abbildung 1-6 dargestellt. Bei der mMDH handelt es sich entsprechend um die Aminosäuren His-176, Asp-149 und Arg-152.

Abbildung 1-6: Das Histidin-Asparagin-Paar der cMDH.



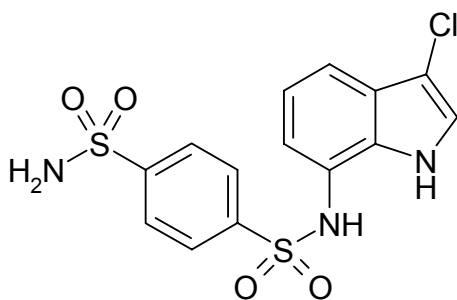
Das Histidin-Asparagin-Paar spielt eine entscheidende Rolle beim Wasserstofftransfer zwischen Coenzym und Substrat, der in dieser Abbildung durch die rote Linie angedeutet ist. Asp-158 bildet über seine Carboxylatgruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zum Imidazolring des His-186 aus, das wiederum, ebenfalls über den Imidazolring, eine Wasserstoffbrückenbindung zur Hydroxylgruppe des Malats eingeht. Die Carboxylatgruppen des Malats bilden jeweils Wasserstoffbrücken zu verschiedenen Argininen (Arg-91 respektive Arg-161), die somit das Substrat in der Bindungstasche fixieren.¹⁰

Die für diese Abbildung zugrundeliegende Röntgenstruktur der cMDH wurde unter dem Identifikationscode *5MDH* der Protein Data Bank at the Brookhaven National Laboratory entnommen und von Dr. Lutz Preu (Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig) mit dem Programm *Chimera* modifiziert.⁸ Die blauen Linien stellen die Wasserstoffbrückenbindungen dar.

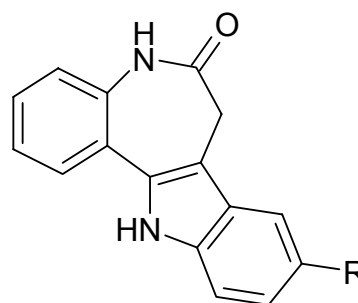
Aufgrund der begrenzten Substrat-Spezifität der Malatdehydrogenasen können diese lediglich L-Malat wie auch *meso*-Tartrat oxidieren. D-Malat fungiert dagegen als Inhibitor. Die Amidierung der 4-Carboxylfunktion von L-Malat führt zur Inaktivierung des Substrats, d. h. die Oxidation des Substrats kann nicht erfolgen. Die einzelnen Malatdehydrogenasen stellen aufgrund ihrer ähnlichen dreidimensionalen Strukturen und aktiven Zentren homologe Enzyme dar.^{5-7, 10-12}

1.2 Malatdehydrogenase als potentielle Zielstruktur therapeutischer Wirkstoffe

Da sich bei soliden Tumoren bis zu 90% aller Tumorzellen in der sog. Ruhephase (G_0 -Phase) befinden, in der keine Zellteilung stattfindet, beschrieben Baker und Bramhall als therapeutisches Konzept bei Tumorerkrankungen die Hemmung von am Energiestoffwechsel und somit an der Zellatmung beteiligten Enzymen (Dehydrogenasen), u.a. der Malatdehydrogenase.¹³⁻¹⁷ Coats und Mitarbeiter zeigten, dass Malatdehydrogenase-Hemmstoffe tatsächlich die Atmung von Ehrlich-Aszites-Zellen inhibieren. Interessanterweise konnten sie eine erhöhte Affinität von lipophilen Verbindungen zu mMDH finden.¹⁸⁻²⁰ Auch in neueren Arbeiten werden Antitumorwirkstoffe wie E7070 (**1**) und Kenpaullon (**2a**) als Hemmstoffe der Malatdehydrogenase beschrieben.^{21, 22}



1



2a R = Br

2b R = NO₂

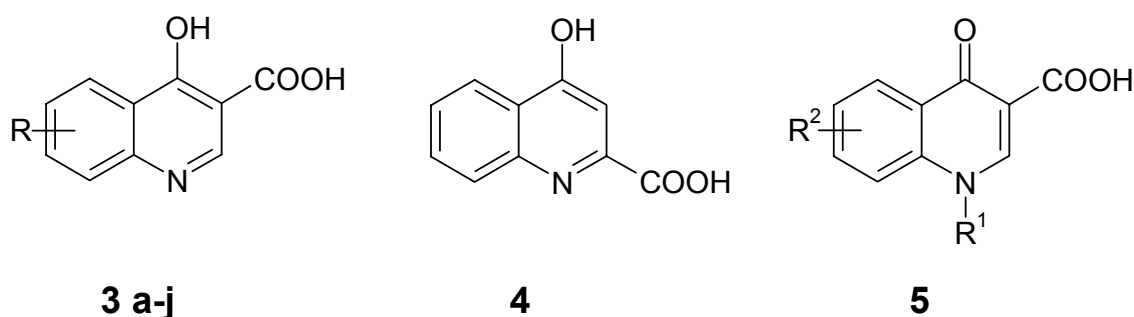
Im Rahmen von Affinitätsuntersuchungen zeigten Paullone ebenfalls eine Affinität zu der in Protozoen-Extrakten von *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*) enthaltenen MDH. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen hemmte Alsterpaullon (**2b**) in vitro das Wachstum des Erregers der südamerikanischen Hautleishmaniose, *Leishmania mexicana*. Aus diesem Befund könnte eine neue Möglichkeit zur Behandlung von Infektionskrankheiten abgeleitet werden.²²

1.3 Hemmstoffe der Malatdehydrogenase

1.3.1 Chinoline

Wie zuvor beschrieben, postulierten Baker und Bramhall als Therapiekonzept zur Behandlung von Tumorerkrankungen den Eingriff in den Energiestoffwechsel von Tumorzellen.¹³ In den Energiestoffwechsel sind häufig Dehydrogenasen als Schlüsselenzyme involviert. Baker und Bramhall zeigten, dass Chinolincarbonsäure-Derivate wie **3a** (R = H) und **4** eine hemmende Aktivität gegenüber Dehydrogenasen, u.a. Malatdehydrogenase, besitzen. Insbesondere **3a** wurde an verschiedenen Positionen modifiziert, um möglichst potente Hemmstoffe zu finden und allgemeingültige Aussagen treffen zu können, welche strukturellen Gegebenheiten für eine sehr gute Hemmaktivität verantwortlich sind.

Abbildung 1-7: Chinolincarbonsäuren **3a** und **4** als Leitstrukturen für die Entwicklung von Hemmstoffen verschiedener Dehydrogenasen.



Eine Substitution am Benzolring von **3a** (R = H) erwies sich in den meisten Fällen als positiv für die Wirkung auf MDH. Ein höherer Effekt als durch eine Monosubstitution wurde durch eine Disubstitution erzielt. So wirkt beispielsweise das 8-Chlor-5-methylderivat **3b** etwa 4-fach, das 6,8-Dichlorderivat **3c** sogar etwa 8-fach stärker als die Leitstruktur **3a** (s. Tabelle 1-1). Auch die Einführung großer Substituenten zeigte keine negativen Auswirkungen auf das inhibitorische Potential, was auf eine hohe Bulktoleranz und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Enzym und Inhibitor schließen lässt. Sehr gute Ergebnisse lieferten die 6,8- und 5,8-disubstituierten Derivate von **3a**. Ihre IC₅₀-Werte liegen alle im niedrigmikromolaren Bereich, wobei die 5,8-disubstituierten Derivate eine besonders gute Aktivität zeigten. Beispielsweise ist das 8-Chlor-5-phenylbutylderivat **3d** etwa 500-fach, das 8-Chlor-5-phenylhexylderivat **3e** sogar etwa 1000-fach aktiver als die Leitstruktur **3a**. Auch die 8-Chlor-5-phenylethylderivate **3f-h** hemmen Malatdehydrogenase im niedrigmikromolaren Bereich (s. Tabelle 1-1). Bei Derivaten mit großen Resten am Benzolring zeigte sich durch eine Substitution am Chinolin-Stickstoff ein Aktivitätsverlust (s. Tabelle 1-1 **3i** und **3j**). Die IC₅₀-Werte der zuvor genannten Verbindungen sind in Tabelle 1-1 aufgeführt. Aus den Untersuchungen mit 1,4-Dihydrochinolon-3-carbonsäuren (**5**) gingen keine nennenswerten Malatdehydrogenase-Hemmstoffe hervor. Ein detaillierter molekularer Hemmmechanismus wird nicht postuliert, allerdings wird angedeutet, dass sehr hydrophobe Verbindungen vermutlich schwerer die Zellmembranen passieren können.¹³⁻¹⁷

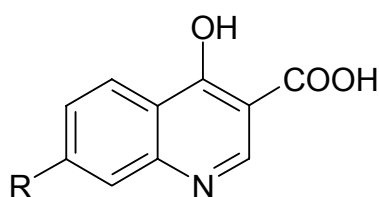
Tabelle 1-1: Inhibition von Malatdehydrogenase durch die von Baker und Bramhall beschriebenen Derivate von **3a** sowie **4** und **5** (IC₅₀ [μM]).

	R	MDH
3a	H	520
4	H	280
5	R ¹ = R ² = H	520
3b	8-Cl, 5-CH ₃	120
3c	6,8-Cl ₂	63
3d	8-Cl, 5-Ph(CH ₂) ₄ -	1.0
3e	8-Cl, 5-Ph(CH ₂) ₆ -	0.46
3f	8-Cl, 5-(2,6-Cl ₂ Ph)-CH ₂ -CH ₂ -	0.10
3g	8-Cl, 5-(2,5-Cl ₂ Ph)-CH ₂ -CH ₂ -	0.19
3h	8-Cl, 5-(2,4-Cl ₂ Ph)-CH ₂ -CH ₂ -	0.11
3i	1-CH ₃	520
3j	1-CH ₃ , 6-Ph-O-(CH ₂) ₃ -O-	> 120*

Die Werte der in dieser Tabelle enthaltenen Verbindungen sind aus den von Baker und Bramhall veröffentlichten Ergebnissen entnommen.¹³⁻¹⁷

* Keine Hemmung bei dieser Konzentration, die der max. Löslichkeit entspricht.

Die Arbeitsgruppe um Coats beschäftigte sich neben der Testung der Chinolincarbonsäurederivate **6** auf inhibitorische Aktivität gegenüber cMDH und mMDH mit deren Einfluss auf die Atmung von Ehrlich-Aszites-Zellen. Ehrlich-Aszites-Zellen stellen ein Testsystem dar, welches Aussagen über die Fähigkeiten von Substanzen zur Penetration durch Zellmembranen ermöglichen soll.



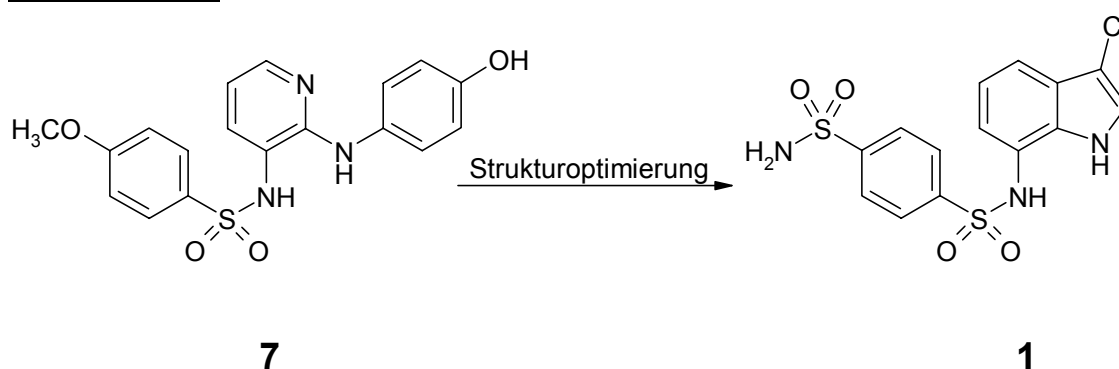
6

Coats et al. zeigten, dass die Hemmung der mMDH mit steigender Lipophilie der Testsubstanzen zunahm, während die Inhibition der Zellatmung zunächst mit steigender Lipophilie der Testsubstanzen ebenfalls stieg, bei zu hoher Lipophilie jedoch wieder sank. Dies führten sie darauf zurück, dass für den Transport durch die Membranen der Ehrlich-Aszites-Zellen ein Lipophilie-Optimum existiert. Für die mMDH-Hemmung und die Inhibition der Zellatmung konnte also kein direkt korrelierender Zusammenhang gefunden werden. Dies wiederum ließ den Schluss zu, dass die Aktivität der untersuchten Substanzen gegenüber mMDH nicht allein für die Hemmung der Zellatmung verantwortlich war, sondern dass additive Effekte zur Wirkung führten. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass aber zumindest ein qualitativer Zusammenhang zwischen der Inhibition der Malatdehydrogenase und der Zellatmung besteht.¹⁸⁻²⁰

1.3.2 E7070

Die Strukturoptimierung des Sulfonamidderivates E7010 (**7**), das die Bildung von Mikrotubuli hemmt, führte zum *N*-(3-Chloro-7-indoyl)-1,4-benzoldisulfonamid E7070 (**1**) (Schema 1-1). Erstaunlicherweise erwies sich E7070 im Gegensatz zu seiner Leitstruktur **7** als inaktiv gegenüber dem Wachstum der Mikrotubuli. Dennoch konnte für E7070 sowohl in vitro als auch in vivo eine signifikante Antitumorwirkung gegenüber dem humanen Dickdarmkarzinom HCT-116 festgestellt werden. In weiteren Untersuchungen wurde neben der Wachstumshemmung auch eine Reduktion der Tumorgröße durch E7070 nachgewiesen. Außerdem zeigte E7070 eine Aktivität gegenüber weiteren Dickdarmkarzinomen (LS174T, SW620 und HCT-15), dem kleinzelligen Lungenkarzinom LX-1 und dem nichtkleinzelligen Lungenkarzinom PC-9.^{23, 24}

Schema 1-1:



Strukturoptimierung der Leitstruktur E7010 (**7**) führte zum besonders aktiven E7070 (**1**).²³

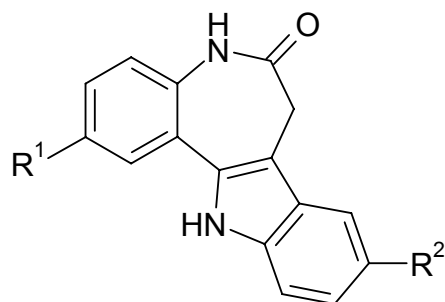
Bei Affinitätsuntersuchungen konnte cytosolische Malatdehydrogenase als biologische Zielstruktur für E7070 identifiziert werden. Es wird ein NADH-kompetitiver Hemmmechanismus angenommen, da NADH in mikromolarer Konzentration die Bindung von E7070 an cMDH unterdrückt. Überraschenderweise wurde kein Zellzyklus-regulierendes Target für E7070 gefunden. Mit der cMDH als Zielstruktur könnte demnach eher das von Baker und Bramhall postulierte und zuvor beschriebene Therapiekonzept des Eingriffs in den Energiestoffwechsel der Tumorzelle für die antitumoralen Effekte von E7070 eine Rolle spielen. E7070 befindet sich derzeit in Prüfungen der klinischen Phase II.²¹

1.3.3 Paullone

Paullone sind 7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one (**2**) mit inhibitorischer Aktivität gegenüber Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK, engl.: cyclin-dependent kinases). In einem Kinase-Assay zeigte Kenpaullon (**2a**) eine Präferenz für CDK1, CDK2 und CDK5. Darüber hinaus konnte eine antiproliferative Wirkung gegenüber Tumorzellen nachgewiesen werden.²⁵ CDK gehören zu den Serin-/Threoninkinasen, die regulierende Aufgaben im Zellzyklus wahrnehmen. Ihre enzymatische Aktivität ist abhängig von der Bildung eines Komplexes mit einem für die jeweilige Zellzyklusphase spezifischen Cyclin.²⁶ Kunick und Mitarbeiter beschrieben, dass eine starke CDK-Hemmung nicht zwangsläufig

eine hohe antiproliferative Wirkung bedingt.^{27, 28} Auch Pies konnte zeigen, dass eine sehr gute Inhibition bestimmter CDK nicht unbedingt mit einer guten Antitumoraktivität einhergeht (Tabelle 1-2).²⁹ So weist das 9-Sulfonylpauillon **2c** trotz einer etwa 4-fach stärkeren Hemmung des CDK1-Cyclin B-Komplexes eine um zwei Größenordnungen schwächere antiproliferative Aktivität als Alsterpauillon (**2b**) auf. Daraus lässt sich folgern, dass auch andere Prozesse an der Wirkung der Paullone auf das Wachstum von Tumorzellen beteiligt sein müssen. Als weitere Targets konnten durch Affinitätsuntersuchungen mit immobilisierten Paullonen Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3 α und GSK-3 β) und mitochondriale Malatdehydrogenase (mMDH) identifiziert werden.²²

Tabelle 1-2: Gegenüberstellung der Hemmung (IC_{50} [μM]) von CDK1/ Cyclin B und der mittleren Antitumoraktivität (\log_{10} MG_MID [M])^a ausgewählter 9-substituierter Paullone.²⁹



	R ¹	R ²	CDK1/cyc B	\log_{10} MG_MID ^a
2a	H	Br	0.400	-4.35
2b	H	NO ₂	0.035	-6.24
2c	OCH ₃	SO ₂ CH ₃	0.009	-4.14

^a Der Meangraph Midpoint (MG_MID) ist der Mittelwert der GI_{50} -Werte für die Tumorzelllinien des NCI-Antitumor Drug Screenings. GI_{50} = Substanzkonzentration, die das Tumorwachstum auf die Hälfte reduziert.

Die GSK-3 (mit ihren Isoformen GSK-3 α und -3 β) ist ebenfalls eine Serin-/Threoninkinase, die ubiquitär im menschlichen und tierischen Gewebe verteilt und in eine Reihe von Stoffwechselprozessen wie z.B. Regulation der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums und der Proliferation sowie in Metabolisierungsreaktionen, inflammatorische Vorgänge und die Apoptose-Kontrolle involviert ist. Desweiteren spielt GSK-3 eine wichtige Rolle im Glucose-Stoffwechsel.^{30, 31} Wie die CDK5 ist die GSK-3 ebenfalls an der Hyperphosphorylierung des

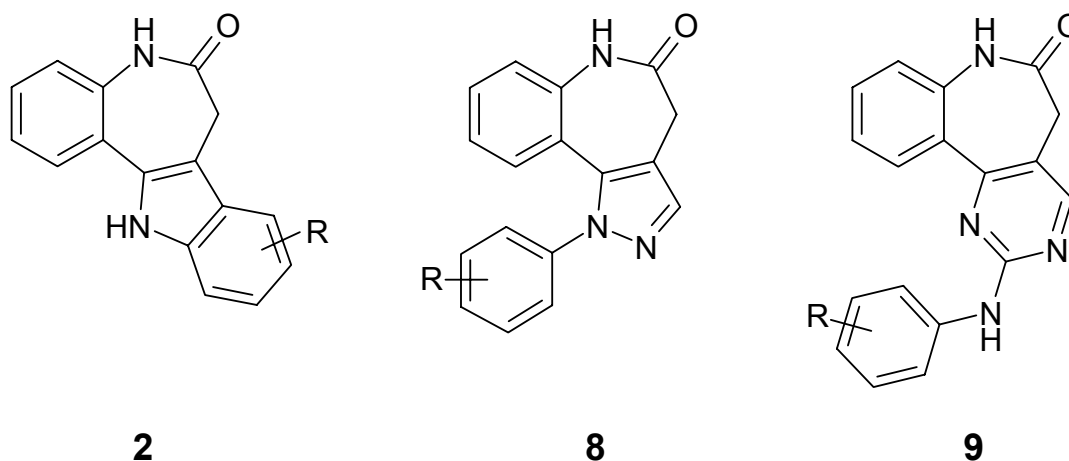
Tau-Proteins beteiligt.³² Alsterpaullon (**2b**) ist aus der Reihe der Paullone der potenteste GSK-3 β -Inhibitor (IC_{50} = 4 nM)³³ und hemmt in Zellkulturen die Phosphorylierung des Tau-Proteins.³⁴

Die Malatdehydrogenase gehört nicht in die Gruppe der Proteinkinasen und stellt somit ein neues und überraschendes Target der Paullone dar. Aus einer Vielzahl verschiedener Zellextrakte konnte durch immobilisierte Paullone mMDH als Paullon-affines Protein identifiziert werden. Eine Anreicherung der Extrakte mit steigenden Konzentrationen an NAD⁺ führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der MDH-Bindung, was den Schluss zulässt, dass NAD⁺ und die Paullone um die selbe Bindungsstelle konkurrieren. Erste Kinetikuntersuchungen bestätigen diese Vermutung und weisen auf einen kompetitiven Hemmmechanismus hin. Die für einige Paullone ermittelten IC_{50} -Werte liegen im mikromolaren Bereich. Interessanterweise zeigen Paullone eine Präferenz für mMDH gegenüber cMDH.²²

2 Problemstellung: *d*-anellierte [1]Benzazepin-2-one als Hemmstoffe der Malatdehydrogenase

Ziel der vorgelegten Arbeit war die Analyse von Struktur-Aktivitätsbeziehungen bei Paullonen und verwandten *d*-anellierten [1]Benzazepin-2-onen im Hinblick auf die Hemmung der mitochondrialen Malatdehydrogenase sowie auf das in vitro Wachstum von Tumorzellen. Ausgehend von der oben erwähnten Beobachtung, dass einzelne Paullone mMDH inhibieren, sollte dafür eine breite Auswahl strukturell möglichst diverser Verbindungen mit Paullon-Grundgerüst **2** auf mMDH-Hemmung getestet werden. In diese Untersuchungen sollten neben bereits bekannten Paullonen die 1-Aryl-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-one des Typs **8** und die 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-one des Typs **9** einbezogen werden. Obwohl einzelne Vertreter der heterozyklischen Grundstruktur von **8** und **9** literaturbekannt sind, mussten für beide Stoffklassen neue Synthesewege erschlossen werden.

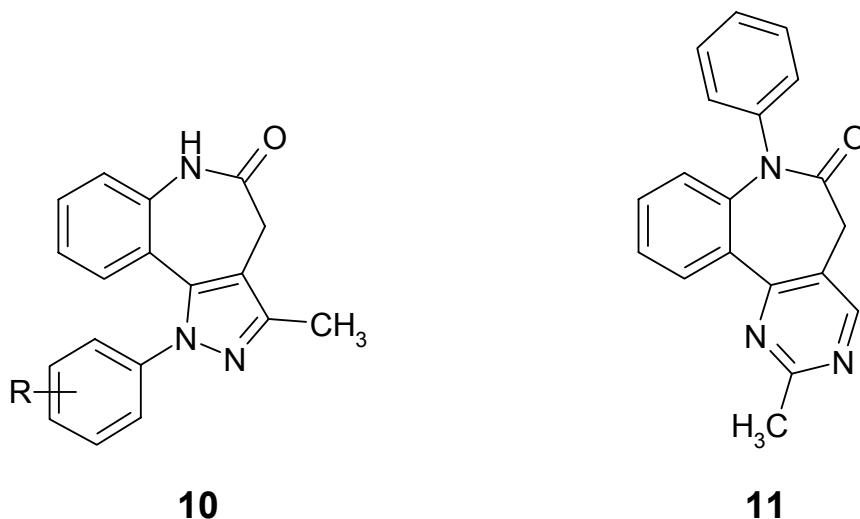
Abbildung 2-1: 1-Aryl-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5-(1*H*)-one **8** und 5,7-Dihydro-6*H*-pyrimido-[5,4-*d*]-[1]benzazepin-6-one **9** als Strukturanaloga zu Paullonen **2**.



Bei den erwähnten literaturbekannten 1-Aryl-4,6-dihydropyrazolo-[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-onen handelt es sich um die von Melani und Mitarbeitern beschriebenen 3-Methylderivate **10**, die jedoch in einer aufwendigen mehrstufigen Synthese gewonnen werden müssen, welche sich zudem für die Darstellung 3-unsubstituierter Verbindungen nicht eignet.³⁵

Den von Chen und Gilman dargestellten Pyrimido[5,4-*d*]-anellierten Benzazepinonen **11** fehlt die in 2-Position verknüpfte Arylaminogruppe der hier neu beschriebenen Verbindungen **9**.³⁶

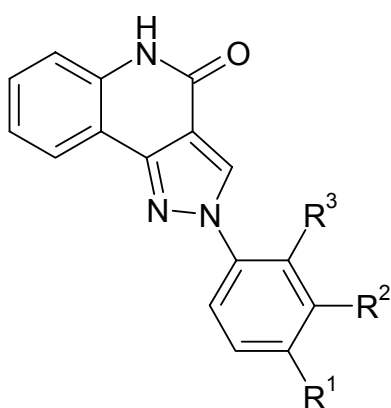
Abbildung 2-2: Literaturbekannte 1-Aryl-4,6-dihydropyrazolo-[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-one **10** und 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-one **11**.



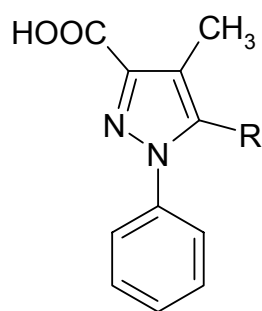
Die Zielstrukturen **8** und **9** wurden ausgewählt, weil 1-Arylpyrazole und 2-Anilinopyrimidine häufig als Strukturelemente in biologisch aktiven Verbindungen zu finden sind. Beispielsweise beschreiben Baraldi et al. 2-Arylpyrazolo[4,3-*c*]chinolin-Derivate **12** als potente und selektive A₃-Adenosin-Rezeptor-Antagonisten.³⁷ Für Adenosin-Rezeptor-Antagonisten lassen sich antiinflammatorische und antiasthmatische Wirkungen nachweisen.³⁸ Menozzi und Mitarbeiter berichten über antiinflammatorische Aktivität der Pyrazole **13**.³⁹ Im Zusammenhang mit einer antiproliferativen Aktivität der neuen Verbindungen ist interessant, dass in Tumorgewebe eine Überexpression von A₃-Adenosin-Rezeptoren vorliegt, die mit einer Erhöhung der Cyclin D1- und NFκB-Spiegel einhergeht. Durch die Gabe von A₃-Rezeptor-Agonisten lässt sich eine Hemmung des

Zellwachstums erzielen. Interessanterweise wirken im Gegensatz dazu A_3 -Rezeptor-Agonisten bei gesunden Zellen wachstumssteigernd.⁴⁰

Abbildung 2-3: Literaturbekannte *N*-Arylpyrazole mit biologischer Aktivität.



12



13

Die Anellierung des [1]Benzazepin-2-on-Grundkörpers mit 2-Anilinopyrimidinen (Zielstruktur **9**) wurde konzipiert, weil 2-Anilinopyrimidinstrukturen häufig als pharmakophores Element in Hemmstoffen von Kinasen vorkommen. Eine der bekanntesten Substanzen dieser Klasse ist das erstmals 2001 zugelassene Imatinib (STI571 - Glivec[®], Novartis Pharma) (**14**). Imatinib hemmt die Bcr-Abl-Tyrosinkinase, die bei Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie überexprimiert wird. Desweiteren hemmt Imatinib die PDGFR-, die Stem Cell Factor (SCF)- und die c-KIT-Tyrosinkinase.^{41, 42} Anwendungsgebiete sind daher die Philadelphia-

Chromosom (Bcr-Abl)-positive chronisch-myeloische Leukämie (CML) und KIT-(CD 117)-positive, nicht reserzierbare und/oder metastasierte maligne gastrointestinale Stromatumore (GIST).⁴³

Die von Sammond und Mitarbeitern beschriebenen 2-Anilino-pyrimidine **15** hemmen die VEGFR-2-Tyrosinkinase und zeigen antiproliferative Aktivität.⁴⁴

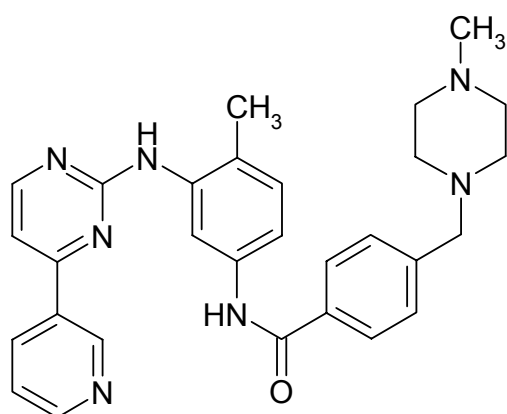
Bingham et al. berichten von Anilinopyrimidinen **16**, die durch Hemmung der I κ B-Kinase 2 (IKK2) neue Behandlungsmöglichkeiten von Autoimmunerkrankungen und entzündlichen Krankheiten (z.B. rheumatoide Arthritis) bieten könnten.⁴⁵ Die Aktivierung eines I κ B-Kinase-Komplexes (IKK) führt zur Phosphorylierung und nachfolgend zum proteolytischen Abbau des I κ B-Moleküls. Daraus resultiert die Freisetzung des NF κ B-Moleküls, das durch Bindung an die NF κ B-Bindungsstelle im Zellkern die Transkription von inflammatorischen Proteinen induziert.⁴⁶

Mit 4-Thiophenoxy-*N*-(3,4,5-trialkoxyphenyl)pyrimidin-2-aminen (**17**), welche die T-Zell Tyrosin Kinase p56lck hemmen, beschäftigen sich Moffat und Mitarbeiter. Diese Verbindungen könnten ihren Einsatz als Immunsuppressiva z.B. bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen oder zur Vorbeugung von Transplantat-Abstoßungen nach Organtransplantationen finden.⁴⁷

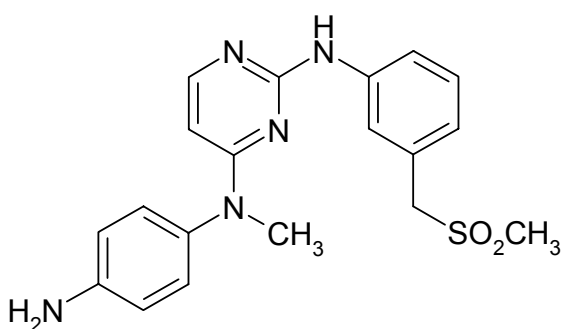
Diese oben genannten Beispiele weisen bereits auf vielfältige biologische Aktivitäten der Anilinopyrimidine hin. Weitere Beispiele für biologisch aktive Anilinopyrimidine lassen sich in der Literatur finden. Neben einer häufig berichteten Hemmung von Cyclin-

abhängigen Kinasen (inbes. CDK1, CDK2 und CDK4), werden auch fungizide Eigenschaften, Aktivität gegenüber dem *Mycobacterium tuberculosis* sowie antagonistische Wirkung auf den Corticotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor (CRH₁-R) beschrieben.⁴⁸⁻⁵³

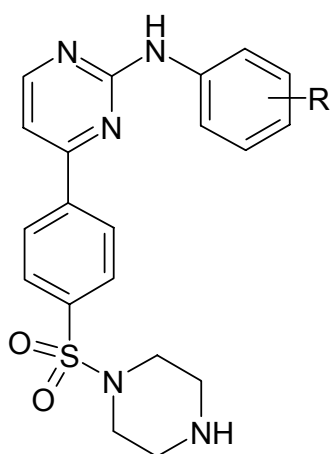
Abbildung 2-4: Literaturbekannte Kinaseinhibitoren mit 2-Anilino-pyrimidin-Teilstruktur.



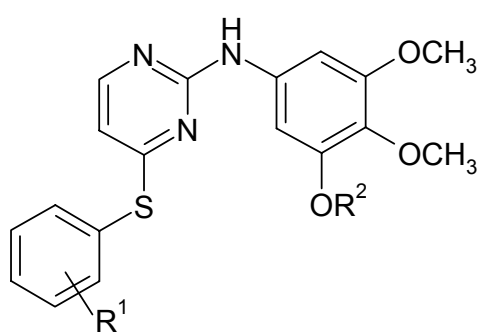
14



15



16



17

Um die neuen Substanzen im Hinblick auf antiproliferative Aktivität möglichst umfassend zu charakterisieren, sollten diese neben der Testung der MDH-Inhibition auch auf die Hemmung tumorrelevanter Proteinkinasen und auf die Hemmung des Wachstums von Tumorzellen geprüft werden.

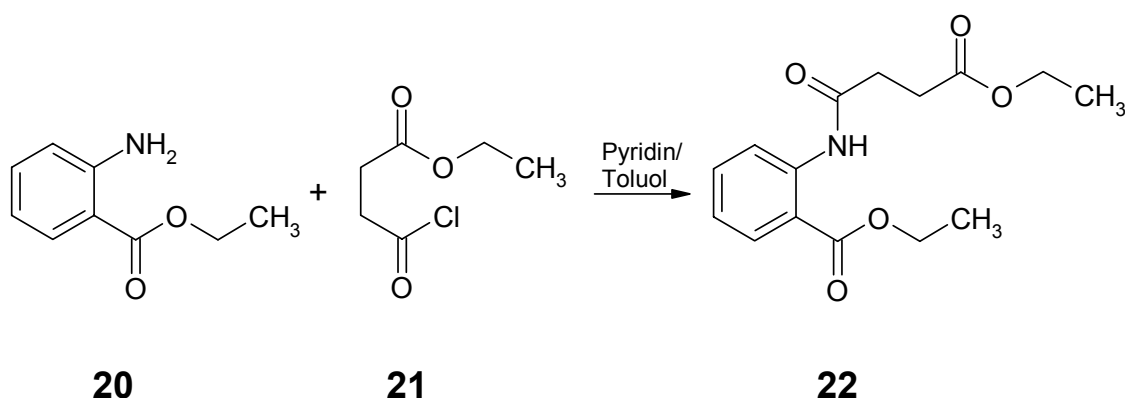
Ein weiterer Abschnitt dieser Arbeit war der Stabilität der als potentielle MDH-Inhibitoren untersuchten Paullone gewidmet. Da bei biologischen Testungen häufig DMSO-Lösungen der zu untersuchenden Substanzen eingesetzt werden, sollte das Verhalten der Paullone in DMSO unter üblichen Labor- und Lagerbedingungen überprüft werden. Als Modellsubstanz wurde Kenpaullon (**2a**) gewählt.

3 Synthesen

3.1 Synthese des 4-[(Dimethylamino)methylen]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dions

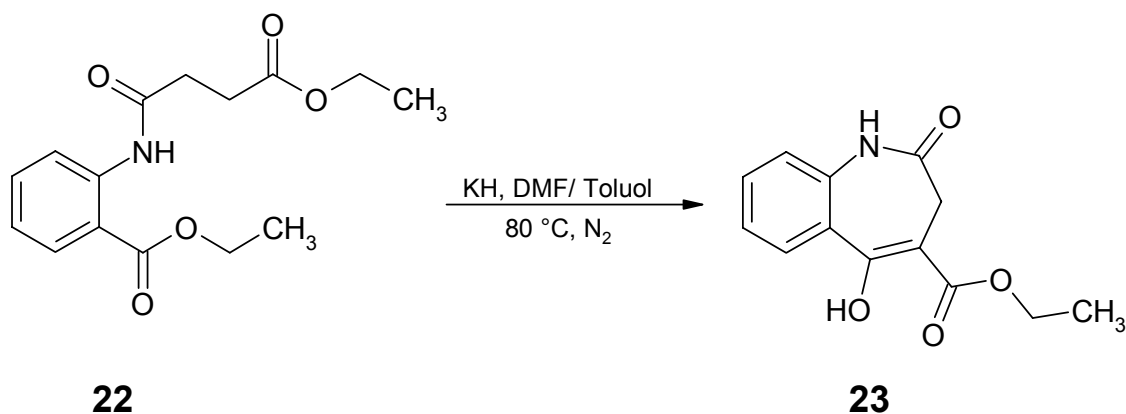
Das von Chen und Gilman beschriebene 4-[(Dimethylamino)methylen]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) sollte als Ausgangsverbindung für die Synthese von Paullon-Analoga genutzt werden.³⁶ Das als Vorstufe benötigte 1*H*-[1]Benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dion (**19**) wurde jedoch nicht nach der Methode von Chen und Gilman, sondern nach der von Kunick⁵⁴ entwickelten und von Link⁵⁵ und Schultz⁵⁶ modifizierten Methode dargestellt. Im ersten Schritt wurde Anthranilsäureethylester (**20**) mit Bernsteinsäureethylesterchlorid (**21**) unter Zusatz von Pyridin zu 2-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]benzoesäureethylester (**22**) acyliert (Schema 3-1).

Schema 3-1:



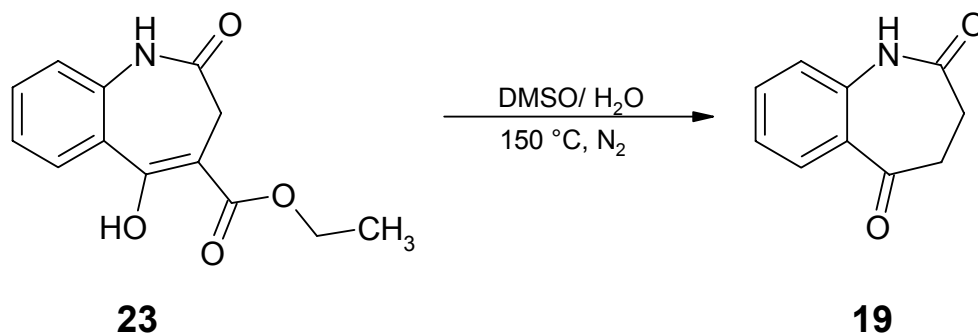
Durch eine Dieckmann-Kondensation ließ sich **22** mit Kaliumhydrid unter Stickstoff zu 5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-4-carbonsäureethylester (**23**) cyclisieren (Schema 3-2).

Schema 3-2:



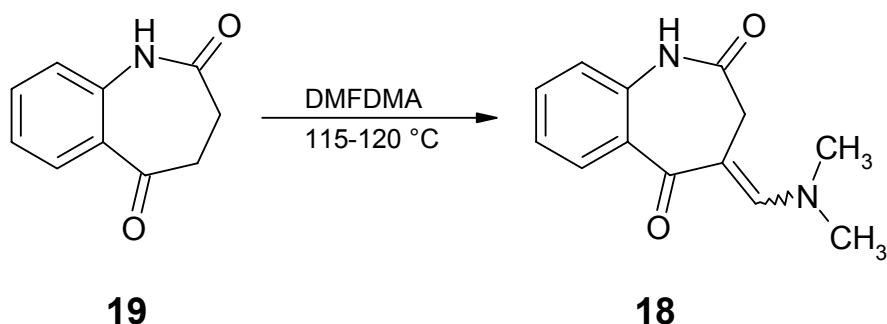
Erhitzen von **23** in wasserhaltigem DMSO führte durch eine Dealkoxycarbonylierung zum gewünschten Produkt **19** (Schema 3-3).

Schema 3-3:



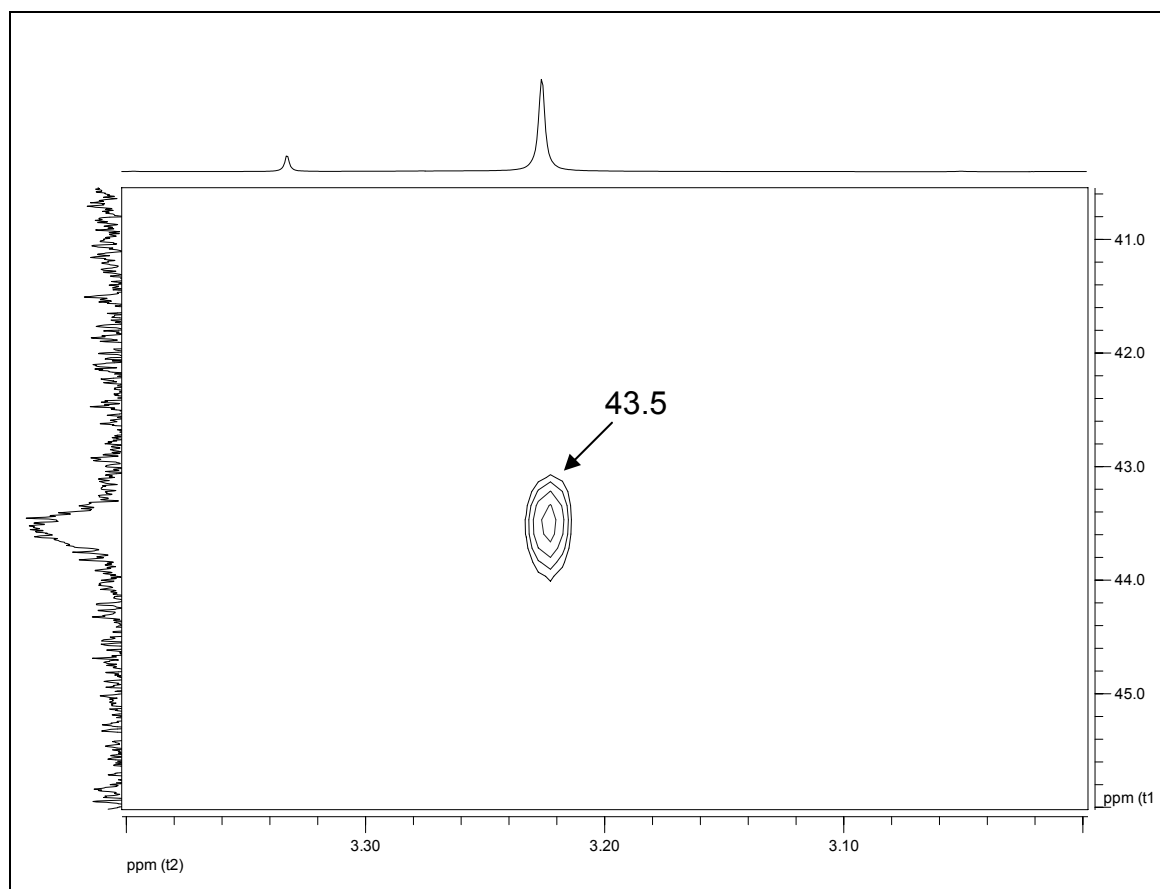
Das 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) wurde durch Erwärmen bei 115-120 °C in Dimethylformamiddimethylacetal (DMFDMA) hergestellt (Schema 3-4).³⁶

Schema 3-4:



Die analytischen Daten von **18** stimmten mit den Daten von Chen und Gilman überein. Da diese aber in ihrer Veröffentlichung keine ¹³C-NMR-Daten angeben, wurden die Daten im Rahmen dieser Arbeit erhoben. Im ¹H-NMR-Spektrum fielen die Signale für die beiden Methylgruppen und die Methylenbrücke des Azepinonrings zu einem Singulett bei 3.22 ppm zusammen. Das Signal bei 31.2 ppm ließ sich aufgrund seiner Lage im ¹³C-NMR-DEPT-Spektrum eindeutig dem Methylenkohlenstoffatom zuordnen, wohingegen kein eindeutiges Signal für die beiden Methylkohlenstoffatome zu finden war. Allerdings ließ sich im HMQC-Experiment ein Kreuzsignal bei 43.5 ppm für diese Kohlenstoffatome finden (Abbildung 3-1).

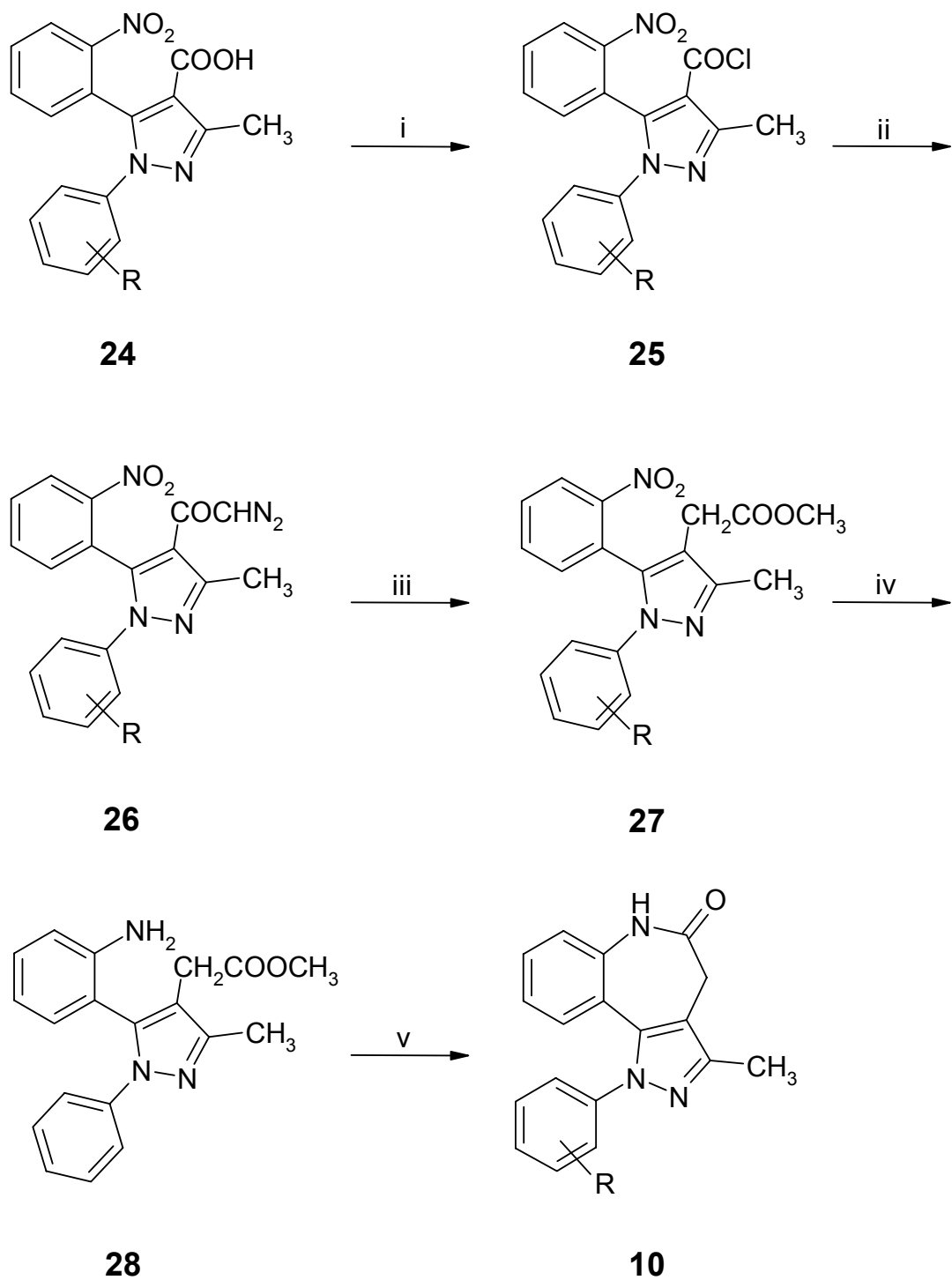
Abbildung 3-1: HMQC-Spektrum (Ausschnitt) von Verbindung **18**.



3.2 Synthese der 1-Aryl-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*]-[1]benzazepin-5(1*H*)-one

Melani et al. beschrieben bereits 1986 einen Syntheseweg zur Darstellung von Arylpyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-onen. Dabei handelt es sich um die 3-Methylderivate **10**, die in einer aufwendigen mehrstufigen Synthese gewonnen werden müssen. Diese Methode eignet sich nicht für die Darstellung 3-unsubstituierter Verbindungen (Schema 3-5). Melani et al. gehen dazu von der 1-Aryl-3-methyl-5-(2-nitrophenyl)-pyrazol-4-carbonsäure (**24**) aus, die zunächst durch Thionylchlorid zum Säurechlorid **25** umgesetzt wird. Das Diazoketon **26** lässt sich durch Reaktion von **25** mit Diazomethan erhalten. Eine anschließende Wolff-Umlagerung in Methanol führt zum Carbonsäuremethylester **27**. Die Reduktion der Nitrogruppe von **27** ergibt das Anilinderivat **28**, das schließlich zum gewünschten Arylpyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-on **10** ringgeschlossen werden kann.³⁵

Schema 3-5: Syntheseweg zur Darstellung der Arylpyrazolo-[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-one **10** nach Melani und Mitarbeitern.³⁵

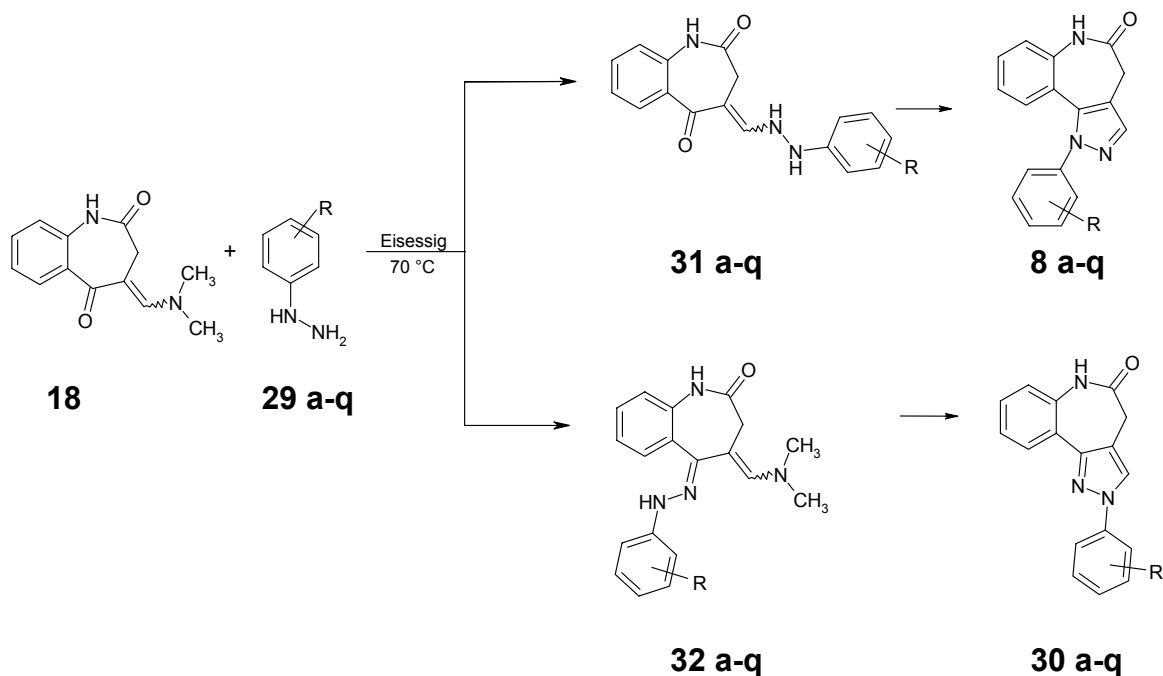


i: SOCl₂; ii: H₂CN₂, Diethylether; iii: Silberbenzoat/ Triethylamin (1:10), Methanol;
iv: 10% Pd/ C, H₂, 50 Psi, Ethylacetat; v: Natriummethanolat

Alternativ sollte eine Synthese entwickelt werden, die die Darstellung von 3-unsubstituierten Arylpyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-onen **8** zuläßt. Dazu wurde zunächst versucht, **18** unter den von Al-Saleh et al.⁵⁷ beschriebenen Versuchsbedingungen mit Phenylhydrazinen (**29**) in Ethanol zu **8** bzw. **30** umzusetzen. Es ließ sich jedoch keines der erwarteten Produkte isolieren; die Methode wurde verworfen.

Sowohl Schenone et al.⁵⁸ als auch Olivera et al.⁵⁹ beschrieben Pyrazolsynthesen über Enaminone als Zwischenstufen in essigsaurem Milieu. In Anlehnung daran entstanden in Essigsäure aus **18** und Phenylhydrazinen (**29**) einheitliche Produkte. Zwei mögliche Reaktionswege über **31** oder **32** als Zwischenstrukturen waren vorstellbar (Schema 3-6).

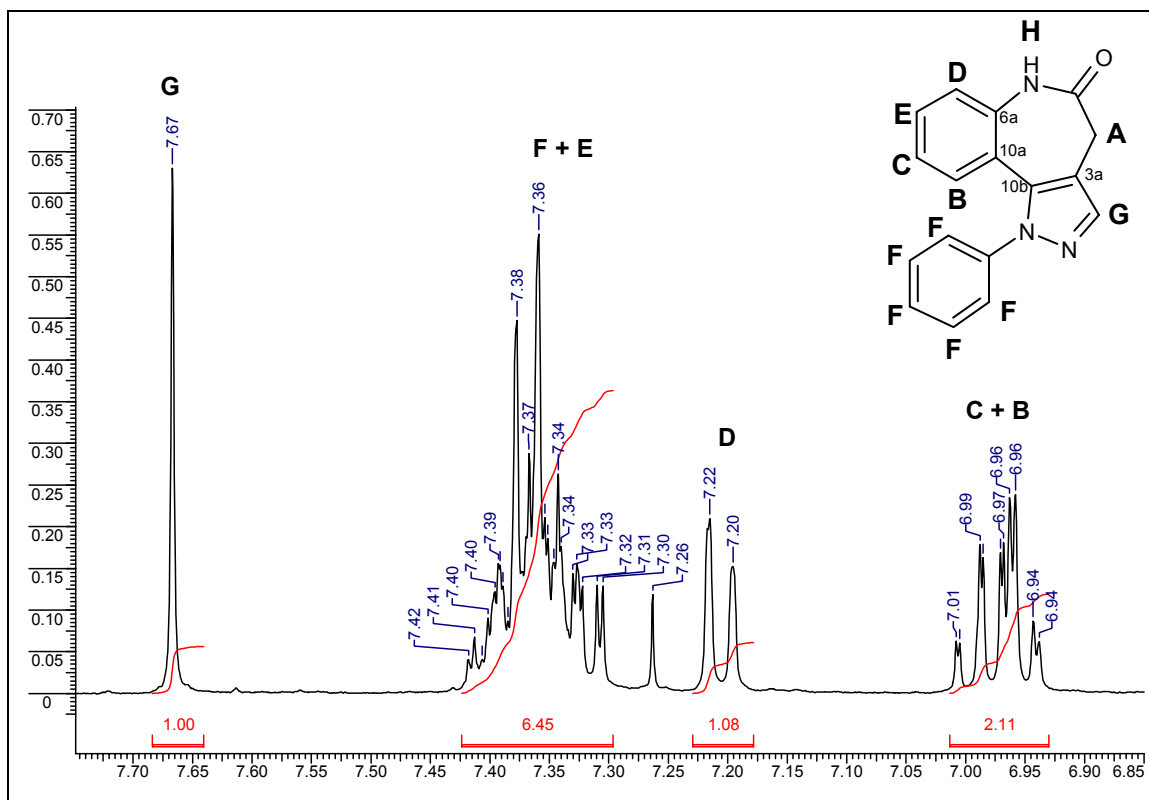
Schema 3-6: Vorstellbare Reaktionswege zur Erschließung der Arylpyrazolo-[1]benzazepin-5-one.



Die ^1H -, ^{13}C - und IR-Spektren bewiesen, dass eines der erwarteten Endprodukte **8** oder **30** entstanden war. Da jedoch für beide Strukturen ähnliche Signale zu erwarten waren, konnte zunächst keine Aussage darüber getroffen werden, welches der Regioisomere tatsächlich entstanden war. Die Auswertung der HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation)- und der HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)-Spektren ermöglichte zwar die Zuordnung aller Signale zu den entsprechenden H- bzw. C-Kernen, erlaubte jedoch keine eindeutige Entscheidung zwischen den Strukturen **8** und **30**.

Im ^1H -NMR-Spektrum ließen sich folgende Signale eindeutig zuordnen: das Singulett bei 8.59 ppm (Intensität 1H) gehört zum NH des Lactams; das Singulett bei 7.67 ppm (Intensität 1H) ist dem Proton des Pyrazolrings zuzuordnen; das Singulett bei 3.45 ppm (Intensität 2H) resultiert von der Methylengruppe des Azepinonrings. Im Bereich von 7.32 - 7.42 ppm liegt ein Multiplett mit der Intensität 6H, das alle Protonen des Phenylrests von **8a** respektive **30a** und ein Proton des Aromaten des Benzazepinons umfasst. Da ansonsten nur zwei doppelte Dubletts und nur ein doppeltes Triplett im aromatischen Bereich außerhalb des erwähnten Multipletts zu finden sind, fallen in diesem die Signale des am Pyrazol substituierten Phenylrests und das zweite doppelte Triplett des Benzazepinons zusammen (Abbildung 3-2).

Abbildung 3-2: ^1H -NMR-Spektrum (aromatischer Bereich) von Verbindung **8a**.



Im ^{13}C -NMR-Spektrum konnten aufgrund ihrer Lage folgende Signale ebenfalls eindeutig zugeordnet werden: bei 32.5 ppm liegt das Signal der Methylenbrücke, bei 174.7 ppm das Signal des Carbonylkohlenstoffatoms. Die Signale bei 125.3 und bei 129.69 ppm zeigen eine doppelte Signalintensität und sind den Kohlenstoffatomen des Phenylsubstituenten mit der Bezeichnung **F** zuzuordnen.

Das Methin-Proton (**G**) zeigt im HMQC-Spektrum (Abbildung 3-3) eine Kreuzkopplung mit dem tertiären Kohlenstoffatom bei 138.8 ppm, so dass sich dieses Signal eindeutig dem Methin-Kohlenstoffatom zuordnen lässt. Für die Signale bei 125.3 und bei 129.69 ppm finden sich Kreuzsignale zum tieffeldverschobenen Teil

des Multipletts zwischen 7.32 - 7.42 ppm, die zum Phenylring (**F**) gehören.

Ausgehend von den bereits zugeordneten Signalen ließen sich die restlichen Signale mit Hilfe des HMBC-Spektrums (Abbildung 3-4) zuordnen. Die CH₂-Gruppe des Azepinonrings zeigt Kreuzsignale mit 118.0, 136.7, 138.8 und 174.7 ppm. Die Signale bei 138.8 und 174.7 ppm sind bereits dem Methin-Kohlenstoffatom und dem Carbonyl-Kohlenstoffatom zugeordnet. Die anderen beiden Signale sind Signale zweier quartärer Kohlenstoffatome. Die Kreuzkopplung zu 136.7 resultiert aus einer ³J-Kopplung und ist daher dem Kohlenstoffatom 10b zuzuordnen. Somit kann 118.0 nur noch zum quartären Kohlenstoffatom in direkter Nachbarschaft zur CH₂-Gruppe des Azepinonrings (C_{3a}) gehören. Das Lactam-Proton zeigt im HMBC-Spektrum Kreuzpeaks zu 32.5 (CH₂-Gruppe), 121.3, 123.2 und 174.7 (C=O) ppm. Das Signal bei 121.3 ppm resultiert aus einem quartären Kohlenstoffatom. Von den infrage kommenden Kohlenstoffatomen C_{6a} und C_{10a} ist aufgrund der geringen chemischen Verschiebung letzteres dem betreffenden Signal zuzuordnen. Das Signal bei 123.2 ppm rührt von einem tertiären Kohlenstoffatom her und kann daher lediglich zum Kohlenstoff mit der Bezeichnung **D** gehören. Das Dublett des Protons in Position **D** zeigt im HMBC-Spektrum wiederum Kreuzsignale mit 121.3 (s.o.), 124.7, 135.5 und 136.7 (s.o.) ppm. Das Signal bei 124.7 ppm kann somit dem tertiären Kohlenstoffatom **C** (Pos. 9) und das Signal bei 135.5 ppm dem quartären Kohlenstoffatom in Position 6a zugeordnet werden.

Da alle quartären Kohlenstoffatome außer 140.3 ppm eindeutig zugeordnet werden konnten, muss es sich bei dieser Verschiebung

um das Signal für das quartäre Kohlenstoffatom des Phenylrestes handeln.

Nach der Zuordnung der Kohlenstoffsignale konnten anhand der weiteren Kreuzpeaks im HMQC (Abbildung 3-3) die restlichen ^1H -NMR-Signale den zugehörigen Protonen zugewiesen werden.

Eine Entscheidung zwischen den beiden alternativen Strukturen **8a** und **30a** konnte auf der Grundlage der hier vorgelegten NMR-Daten nicht getroffen werden. Zwar zeigt das Proton **G** (7.67 ppm) im HMBC-Spektrum ein Kreuzsignal mit dem quartären Kohlenstoffatom des Phenylsubstituenten (140.3 ppm), dieses Signal könnte jedoch sowohl auf einer 3J -Kopplung (Strukturvorschlag **30**) wie einer 4J -Kopplung (Strukturvorschlag **8**) beruhen. Den endgültigen Beweis für die Struktur von **8a** erbrachte die Röntgenkristallstrukturanalyse (Abbildung 3-5), welche die in Abbildung 3-6 aus den 2D-Spektren abgeleitete Signalzuordnung bestätigte.

Abbildung 3-3: HMQC-Spektrum (Ausschnitt) von Verbindung **8a**.

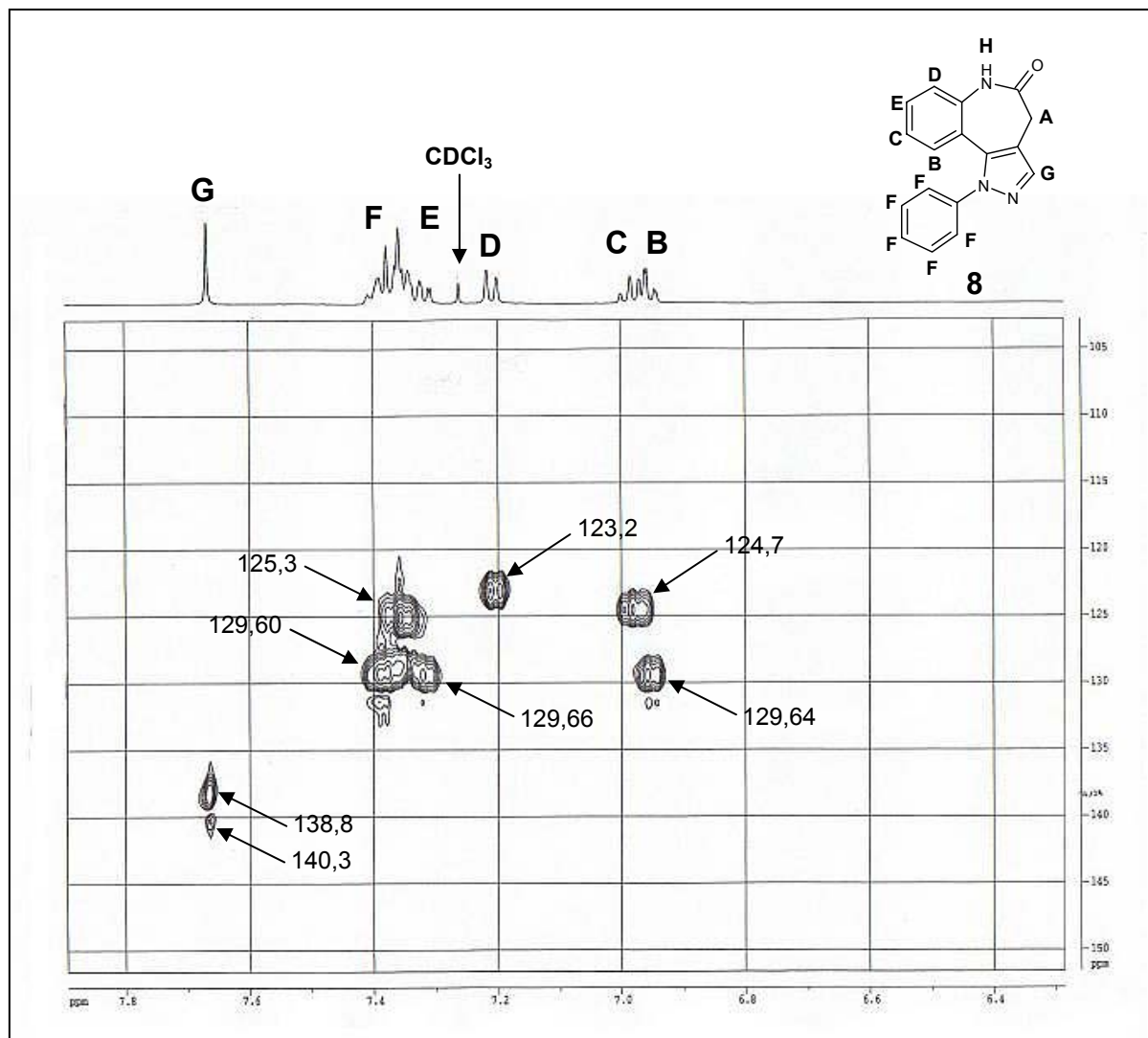


Abbildung 3-4: HMBC-Spektrum (Ausschnitt) von Verbindung **8a**.

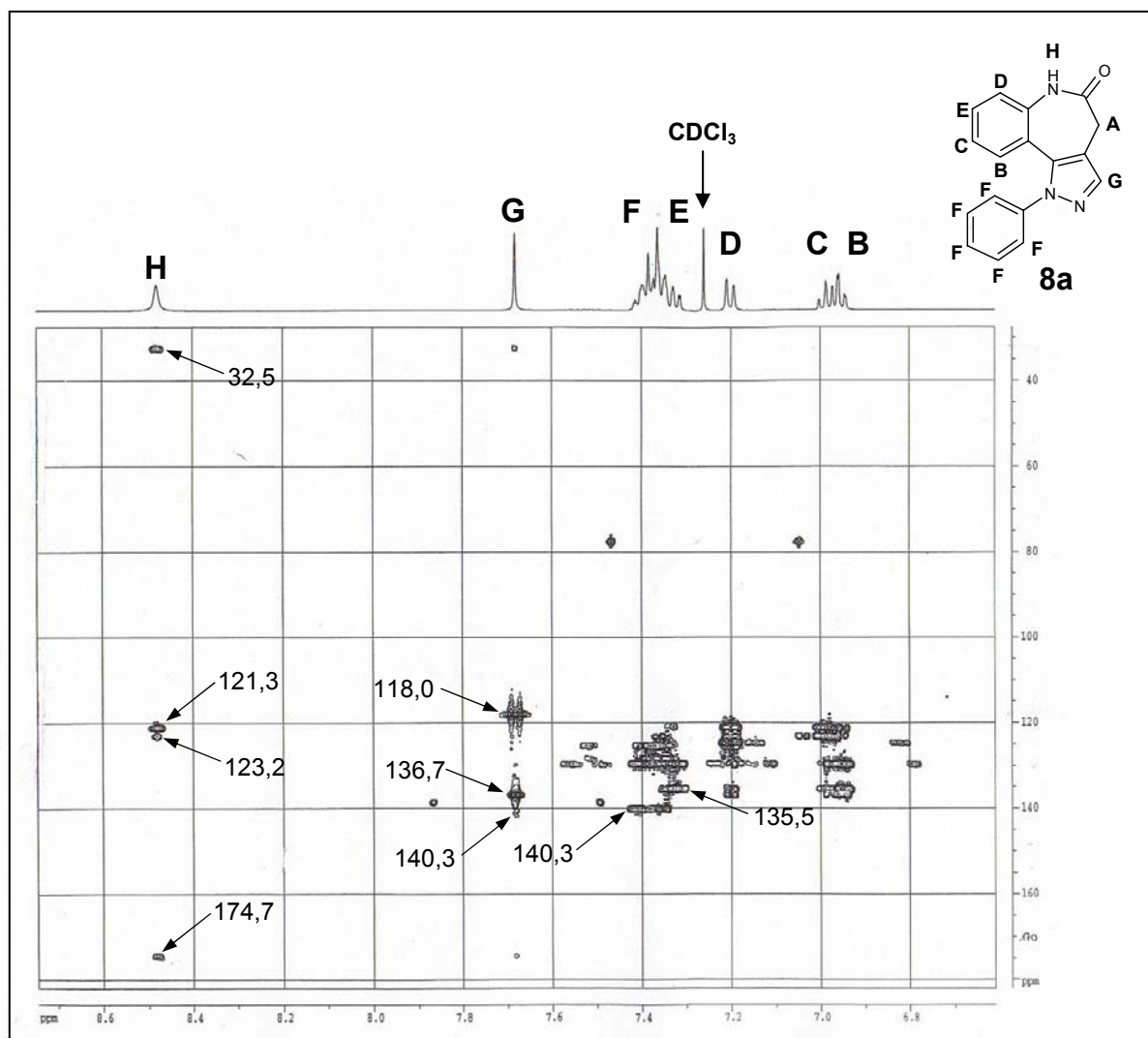
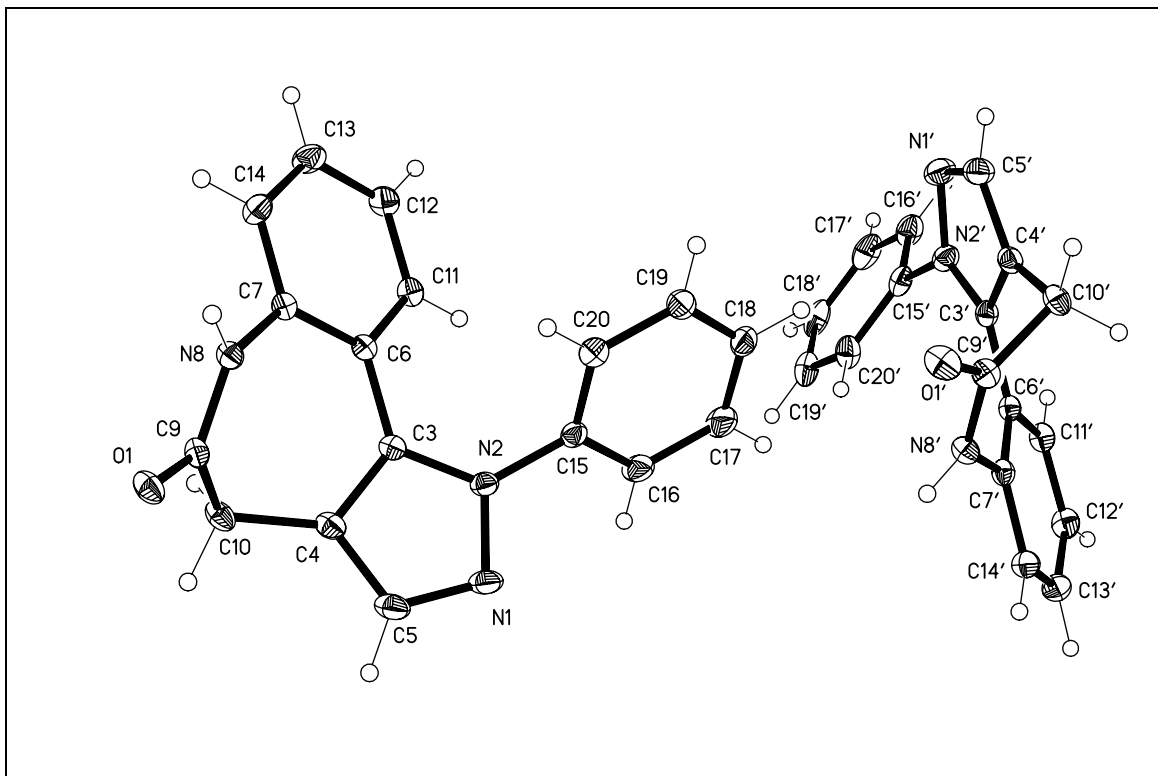
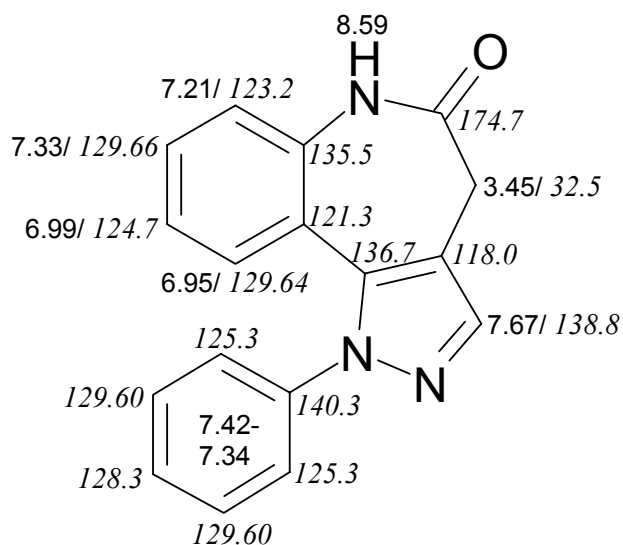


Abbildung 3-5: Röntgenstruktur von Verbindung **8a**.^a



^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

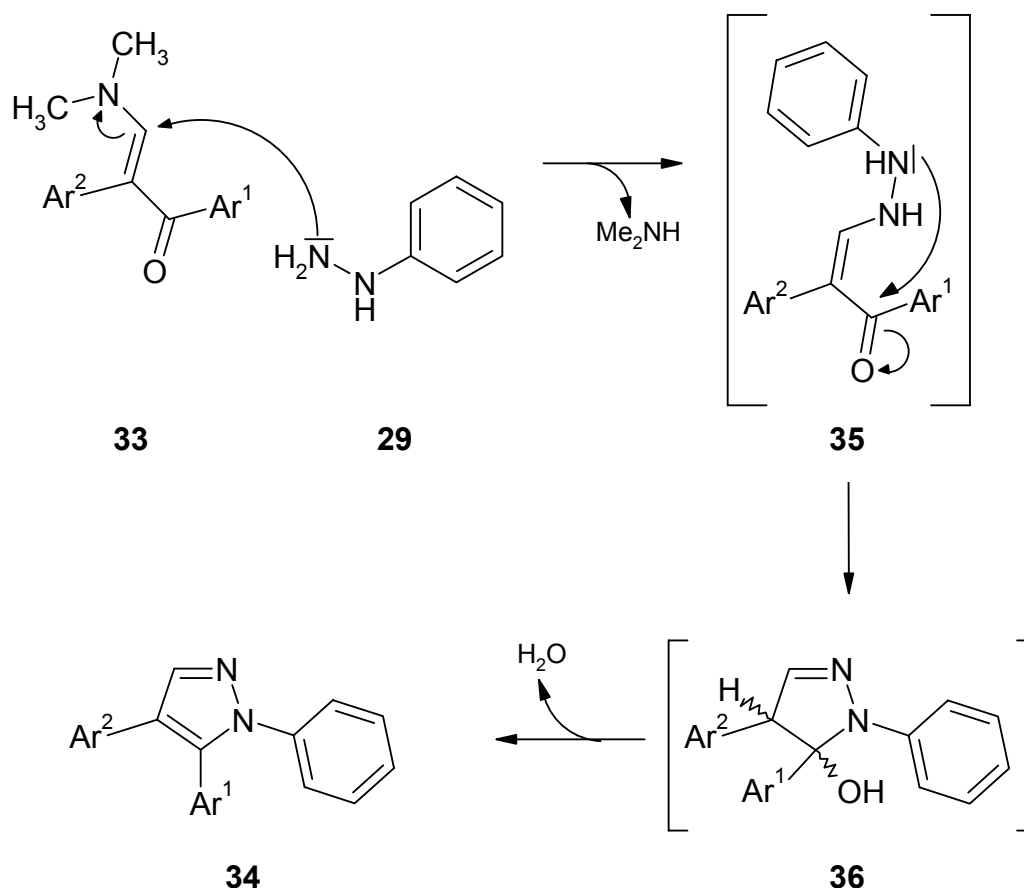
Abbildung 3-6: Signalzuordnung aus den ^1H - und ^{13}C -Spektren enthaltenen Daten für Verbindung **8a**.



Die kursiv angegebenen Zahlen entsprechen der chem. Verschiebung im ^{13}C -NMR-Spektrum für das jeweilige Kohlenstoffatom, die anderen Zahlen entsprechen den chem. Verschiebungen im ^1H -NMR-Spektrum.

Die erhaltene Struktur von **8a** deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen, dass in sauren Lösungen aus Enaminonen des Typs **33** und Phenylhydrazinen (**29**) 1,4,5-substituierte Verbindungen **34** entstehen.⁵⁸⁻⁶⁴ Olivera und Mitarbeiter postulieren den in Schema 3-7 dargestellten Mechanismus.

Schema 3-7: Reaktionsmechanismus für die Synthese 1,4,5-substituierter Pyrazole nach Olivera et al.⁵⁹



Der Arbeitsgruppe um Tonkikh gelang es, das postulierte Zwischenprodukt **35** zu isolieren.⁶³

Auch bei der hier beschriebenen Synthese der Pyrazolderivate **8** gemäß Schema 3-6 (Seite 36) konnte beobachtet werden, dass zunächst eine Suspension entstand, die im weiteren Reaktionsverlauf in eine Lösung überging. Bei der DC-Kontrolle der Reaktionsansätze wurden neben den Eduktflecken zwei Produktflecken detektiert. Mit fortschreitender Reaktionsdauer nahm

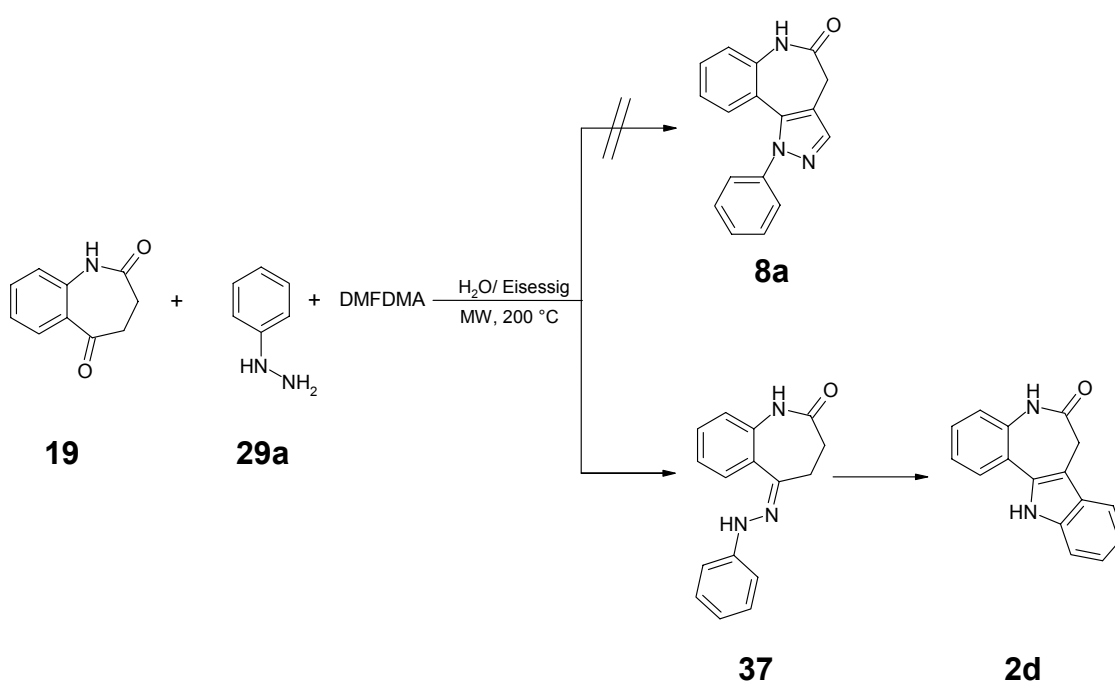
die Intensität eines der Produktflecken immer weiter ab. Unterbrach man die Reaktion nach ca. 5-10 Minuten und isolierte den Niederschlag, erhielt man das gebildete Zwischenprodukt **31**. Führt man die Reaktion bei Raumtemperatur durch, entstand ebenfalls das isolierbare Zwischenprodukt **31**, das sich unter den gleichen Reaktionsbedingungen (Eisessig, 70 °C oder Reflux) wie **18** ebenfalls zum Endprodukt **8** umsetzen ließ. Die Struktur von **31** konnte durch ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektren bestätigt werden.

Nachdem eine konventionelle Darstellungsmethode für die 1-Aryl-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-one (**8**) gearbeitet worden war, sollte untersucht werden, ob die von Molteni und Mitarbeitern beschriebene Mikrowellen-unterstützte Eintopf-Synthese Vorteile bezüglich der Ausbeute, Synthesedauer oder Reinheit bieten würde.⁶² Dazu wurden das 1*H*-[1]Benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dion **19**, DMFDMA und Phenylhydrazin (**29**) in Wasser mit katalytischen Mengen Eisessig bei 180 °C für ca. 15 Minuten in der Synthesemikrowelle (150 Watt) gerührt. Das gewünschte Produkt entstand unter diesen Bedingungen jedoch nicht. Stattdessen konnte das literaturbekannte 7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (Paullon; **2d**)⁶⁵ isoliert werden, das anhand der ¹H-NMR-Daten identifiziert wurde. (Schema 3-8)

Somit läuft unter diesen Bedingungen anstelle der gewünschten Reaktion eine thermisch induzierte Fischer-Indol-Synthese ab.^{66, 67} Da bisher die Mikrowellen-induzierte Darstellung von Paullonen (**2**) noch nicht bekannt war, wurde untersucht, ob diese Methode

generell anwendbar ist und Vorteile gegenüber der konventionellen Paullon-Synthese^{56, 65} bietet.

Schema 3-8: Die unter Mikrowellenbedingungen untersuchte Synthese nach Molteni et al.⁶² führte nicht zum gewünschten Pyrazolderivat **8a** sondern zum literaturbekannten Paullon (**2d**)⁶⁵.



Dazu wurden **19** bzw. **37** unter verschiedenen Bedingungen in der Mikrowelle zum gewünschten Paullon (**2**) umgesetzt. Die Bedingungen, Ausbeuten und HPLC-Reinheiten der Produkte sind in Tabelle 3-1 aufgeführt und gegenübergestellt. Außerdem wurde zum Vergleich auch die von Kunick beschriebene Methode⁶⁵ durchgeführt.

Tabelle 3-1: Vergleich der Mikrowellen-induzierten und der konventionellen Paullon-Synthesen.

Produkt	2d	2a	2a	2d	2d
Methode	nach Kunick ⁶⁵	MW	MW	MW	MW
Edukt	19	19	19	37	37
Bedingungen	1. Eisessig, 70 °C 2. +H ₂ SO ₄	Wasser+ 0.2 ml Eisessig, 180 °C, 150 Watt	Wasser, 180 °C, 150 Watt	Wasser, 180 °C, 150 Watt	Ohne Lösungsmittel, 250 °C, 300 Watt ^b
Dauer	2 h	10 min	20 min	20 min	5 min
Reinheit [HPLC] ^a	97.9%	92.3%	95.2%	98.3%	84.7%
Ausbeute ^a	80.9%	70.0%	75.7%	63.3%	73.5%

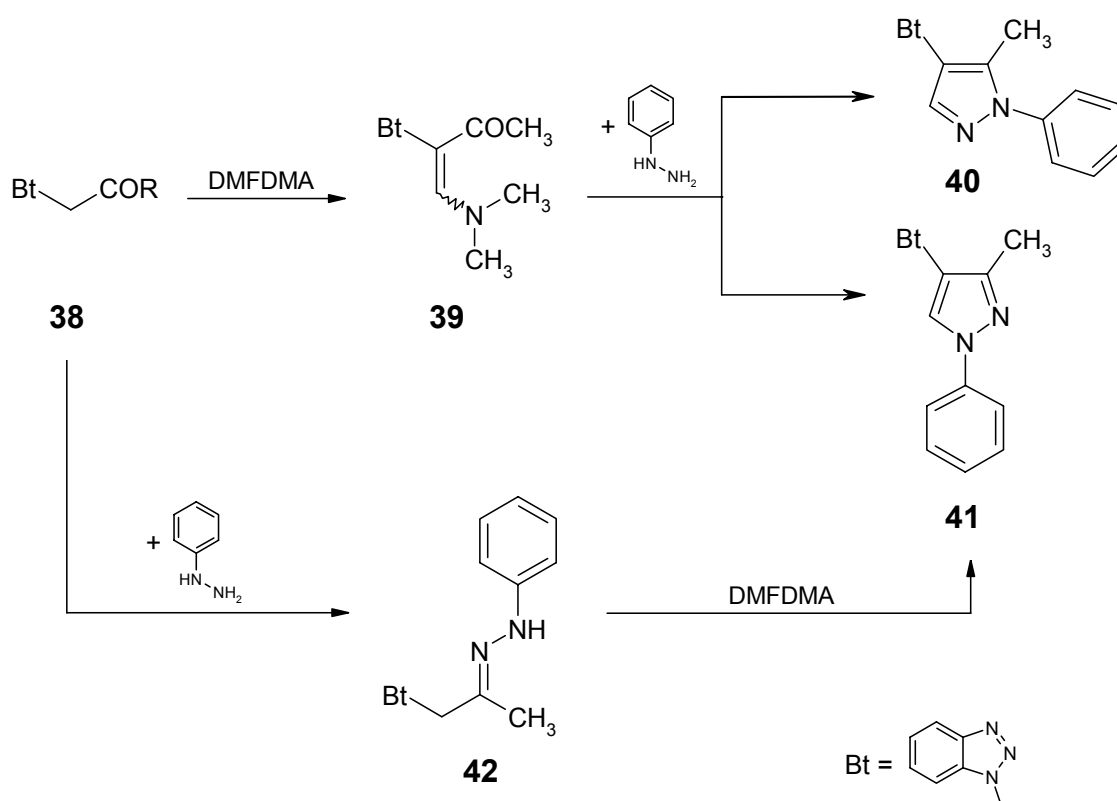
^a vor dem Umkristallisieren

^b Aufarbeitung: in DMSO lösen, anschließend auf Wasser gießen

Es zeigte sich, dass außer deutlich verringerten Reaktionszeiten keine der erprobten Methoden einen Vorteil gegenüber der herkömmlichen Darstellung der Paullone (**2**) bietet. Dennoch könnte sich eine Mikrowellensynthese evtl. für schwer zu erschließende oder säurelabile Indole eignen, denn auch das isolierte Zwischenprodukt **37** konnte unter neutralen Bedingungen in der Mikrowelle zum entsprechenden Indol **2** umgesetzt werden (s. Tabelle 3-1, Spalte 5 und 6).

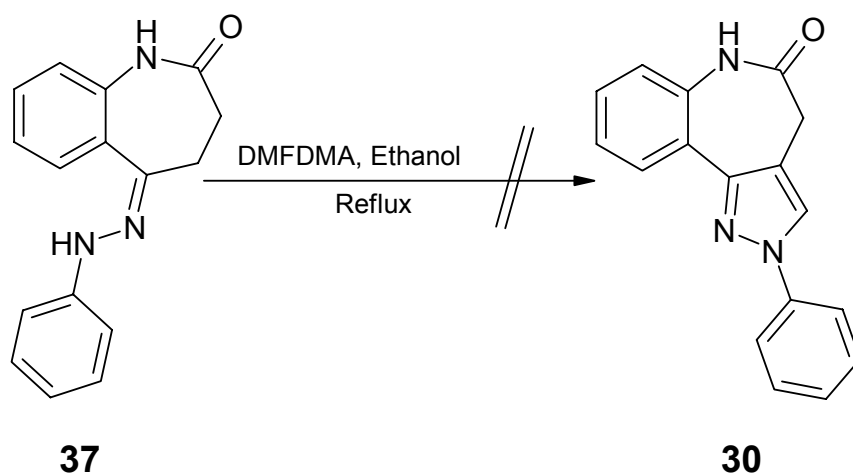
Al-Saleh und Mitarbeiter beschrieben neben der Darstellung von 1,4,5-substituierten Pyrazolen auch die Synthese von 1,3,4-substituierten Derivaten (Schema 3-9).⁵⁷

Schema 3-9: Reaktionswege für die Synthese 1,4,5- und 1,3,4-substituierter Pyrazole nach Al-Saleh et al.⁵⁷



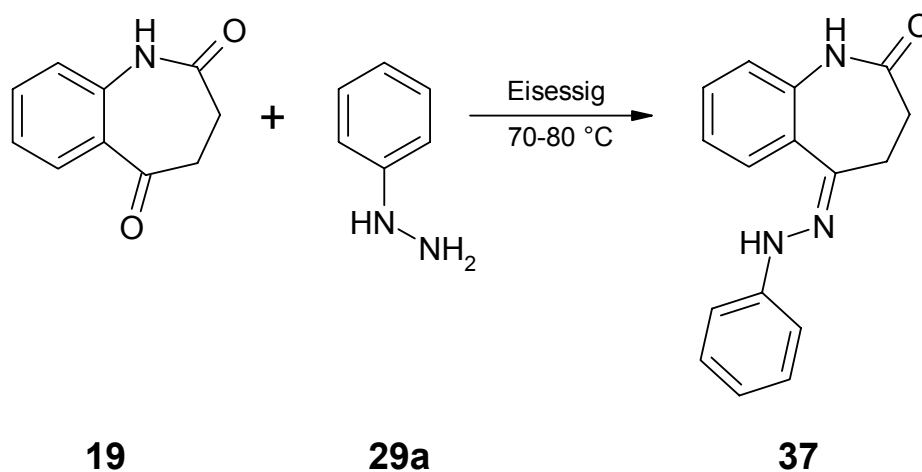
Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Erschließung des am N-2 des heterocyclischen Grundkörpers substituierten Pyrazolderivats **30** jedoch nicht. Der von Al-Saleh beschriebene Syntheseweg über das Hydrazone **37** als Zwischenstufe (Schema 3-10) führte nicht zum Erfolg.

Schema 3-10:



37 wurde nach der von Schultz beschriebenen Methode durch Erwärmen von **19** und Phenylhydrazin (**29a**) in Eisessig erhalten.⁵⁶ (Schema 3-11)

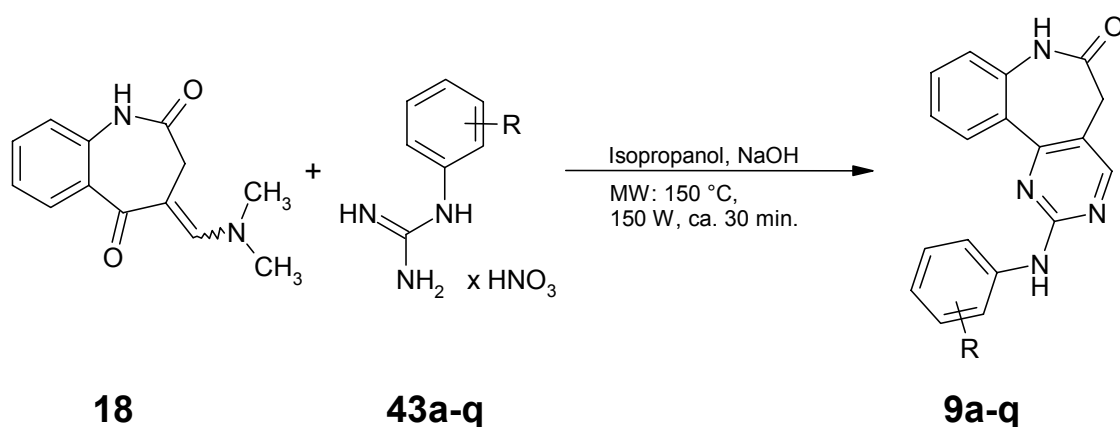
Schema 3-11:



3.3 Synthese der 2-Anilino-5,7-dihydro-6H-pyrimido-[5,4-d][1]benzazepin-6-one

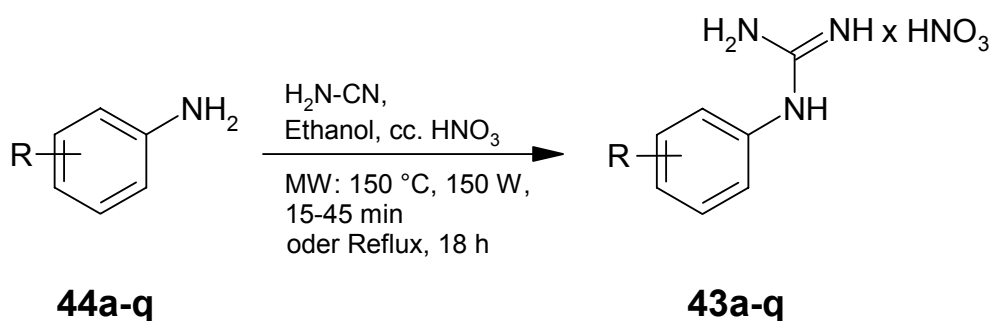
In der Literatur lassen sich zahlreiche Beispiele für die Erschließung von Anilinopyrimidinen ausgehend von Enaminonen finden.^{45, 47-49, 53, 68, 69} In dieser Arbeit wurde das Enaminon **18** (1.0 eq.) mit Arylguanidinen **43a-q** (1.2 eq.) unter den von Moffat und Mitarbeitern beschriebenen Bedingungen (Isopropanol, 1.2 eq. NaOH) zu den gewünschten Anilinopyrimidinen **9** umgesetzt.⁴⁷ (Schema 3-12) Darüber hinaus konnte die Methode zu einem Mikrowellen-induzierten Syntheseverfahren weiterentwickelt werden. Bei der Aufarbeitung der Produkte **9a-q** erwies es sich als vorteilhaft, den aus dem Ansatz erhaltenen Niederschlag vor dem Umkristallisieren mit Wasser zu waschen, um die als Nebenprodukte enthaltenen anorganischen Salze zu beseitigen.

Schema 3-12: Die nach Moffat et al.⁴⁷ modifizierte Methode zur Darstellung der Anilinopyrimidine **9**.



Zunächst mussten die für die Synthese von **9a-q** benötigten Arylguanidine **43a-q** hergestellt werden. Dazu wurde die von Tavares und Mitarbeitern veröffentlichte Methode gewählt.⁴⁹ Zu einer ethanolischen Lösung des entsprechenden Anilins (**44a-q**) wurden zunächst äquimolare Mengen konzentrierter Salpetersäure und anschließend eine 50%ige Cyanamidlösung zugesetzt. Der Ansatz wurde etwa 18 h zum Rückfluss erhitzt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle) wurde der Ansatz eisgekühlt und das Nitrat **43** mit gekühltem Diethylether ausgefällt. Um die Reaktionsdauer zu verkürzen, wurde eine Mikrowellen-Methode unter Beibehaltung der Grundbedingungen (s.o.) entwickelt. Die gewünschten Arylguanidiniumnitrate **43a-q** ließen sich in 15-45 Minuten bei 150 °C und einer Mikrowellenleistung von 150 Watt erhalten (Schema 3-13). Die erhaltenen Produkte mussten mehrfach umkristallisiert werden, um reine Produkte zu erhalten. Durch die Zugabe von Diethylether zum Reaktionsansatz wurden neben dem gewünschten Produkt auch noch in Spuren vorhandenes Anilin (als Nitrat) sowie entstandenes Guanidiniumnitrat ausgefällt. Diese Nebenprodukte konnten eindeutig mittels ¹H-NMR nachgewiesen werden.

Schema 3-13:

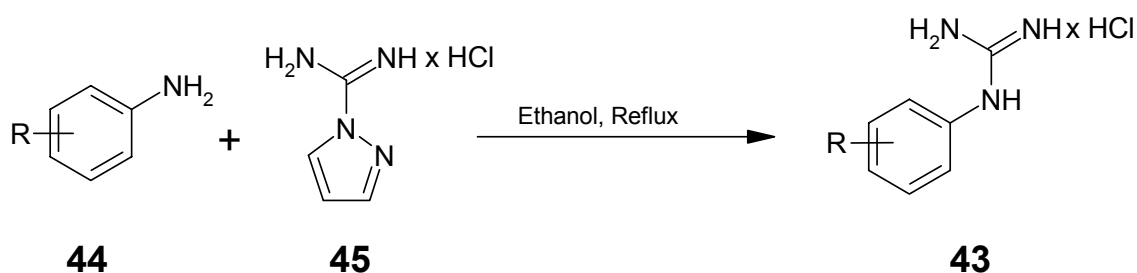


Da bei den oben beschriebenen Methoden zunächst weder Ausbeuten noch Reinheit der Produkte zufriedenstellend waren, wurden weitere Verfahren zur Darstellung der Arylguanidine **43** erprobt. Es sei vorweggenommen, dass diese keinerlei Vorteile gegenüber der zuvor beschriebenen Synthese erbrachten und deshalb nicht weiter verfolgt wurden. Dennoch sollen sie an dieser Stelle kurz beschrieben werden.

Braunerová et al. schmelzen die entsprechenden Aniline mit Cyanamid, lösen anschließend die Schmelze in kaltem Wasser und fällen die Guanidine als Nitrate durch Zugabe von konzentrierter Salpetersäure.⁷⁰ Da unter diesen Bedingungen mittels DC-Kontrolle keine adäquate Umsetzung festgestellt werden konnte, wurden keine weiteren Versuche zur Optimierung dieses Verfahrens unternommen.

Einen anderen Ansatz verfolgen Bredereck et al., welche die Guanylierung nicht durch die direkte Umsetzung mit Cyanamid durchführen, sondern mit dem deutlich reaktiveren 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidin (**45**). **45** reagiert innerhalb von zwei Stunden mit Anilinen (**44**) zum gewünschten Produkt (Schema 3-14). Bei der Verwendung des Hydrochlorids von **45** entstehen die entsprechenden Hydrochloride der Guanidine, die jedoch wesentlich schwieriger zu fällen sind als die entsprechenden Nitrate. Durch den eingesetzten hohen Überschuss des Anilins ist die Reinigung des gefällten Produkts sehr aufwendig.⁷¹ Es wurde deshalb versucht, die Menge des Anilins zu reduzieren, um die Aufarbeitung zu erleichtern, allerdings blieb eine vollständige Umsetzung unter diesen Bedingungen aus.

Schema 3-14:

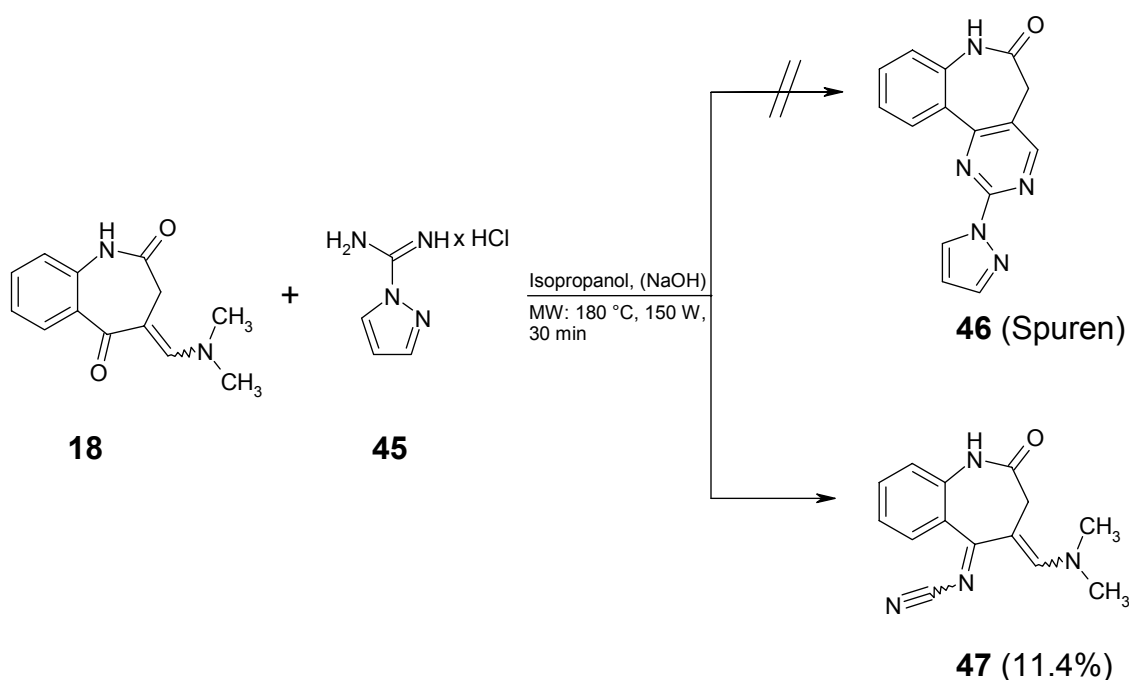


Eine zufriedenstellende Methode für die Darstellung der Arylguanidine **43** wurde schließlich aus dem von Tavares beschriebenen Verfahren entwickelt, indem für einen 40-millimolaren Ansatz das Volumen an Ethanol von 30 ml auf ca. 10 ml reduziert wurde. Unter diesen Bedingungen fielen die gewünschten Arylguanidiniumnitrate beim Abkühlen direkt aus der Lösung aus. Der erhaltene Niederschlag konnte anschließend abgesaugt und umkristallisiert werden. Die Ausbeuten betrugen mit dieser Methode etwa 60%. Neben der Vereinfachung der Aufarbeitung bietet diese Variante den Vorteil, dass auf den peroxidbildenden Diethylether verzichtet werden kann.ⁱ

In Anlehnung an die in Schema 3-12 beschriebene Methode zur Darstellung der Anilinopyrimidine **9** wurde auch das 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidin (**45**) mit dem Enaminon **18** umgesetzt. Das gewünschte Pyrimidinderivat **46** konnte nicht analysenrein gewonnen werden. Stattdessen wurde ein zweites Reaktionsprodukt isoliert, das aufgrund der Ergebnisse der Elementaranalyse nach säulenchromatographischer Aufarbeitung des Reaktionsgemisches sowie spektraler Daten (IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, Massenspektren) als Cyanimin **47** identifiziert werden konnte (Schema 3-15).

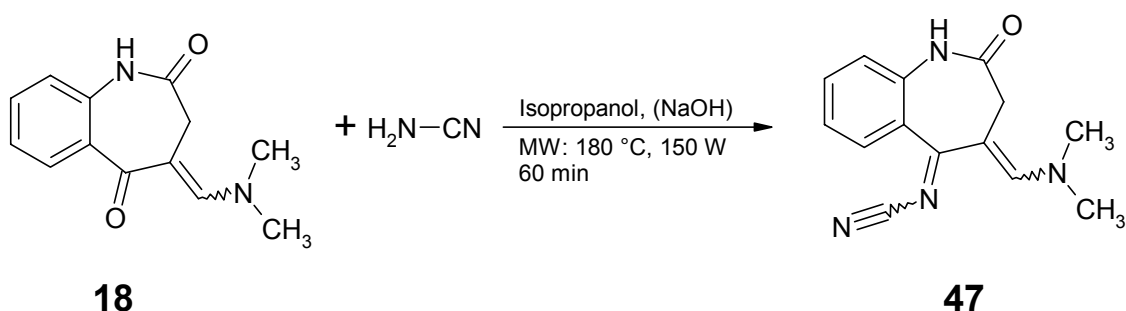
ⁱ Die Arylguanidiniumnitrate wurden in Zusammenarbeit mit Bianca Berger hergestellt.

Schema 3-15:



Wie bei der Guanidinsynthese nach Bredereck et al. (Schema 3-14) überträgt das eingesetzte Carboxamidin **45** ein Cyanamid-äquivalent auf das Enaminon **18**. Um diese These zu stützen, wurde **47** auch durch Reaktion des Enaminons **18** mit Cyanamid dargestellt (Schema 3-16). Die Reaktionszeiten verdoppelten sich im Vergleich zu der Darstellungsmethode mit dem Carboxamidin **45** (Schema 3-15). Darüber hinaus entstanden weitere Nebenprodukte, die jedoch nicht isoliert werden konnten. Dennoch gelang es, das gewünschte Produkt **47** zu isolieren und durch Umkristallisation mit Ethanol zu reinigen.

Schema 3-16:



Die Konfiguration der C,C- und der C,N-Doppelbindungen in der neuen Verbindung **47** ist bisher noch ungeklärt. Weder gelang es aus den ^1H -gekoppelten ^{13}C -Spektren C,H-Kopplungskonstanten abzuleiten, die eine Aussage zur Stereochemie erlauben, noch konnten Kristalle erzeugt werden, die eine kristallographische Strukturanalyse von **47** ermöglicht hätten.

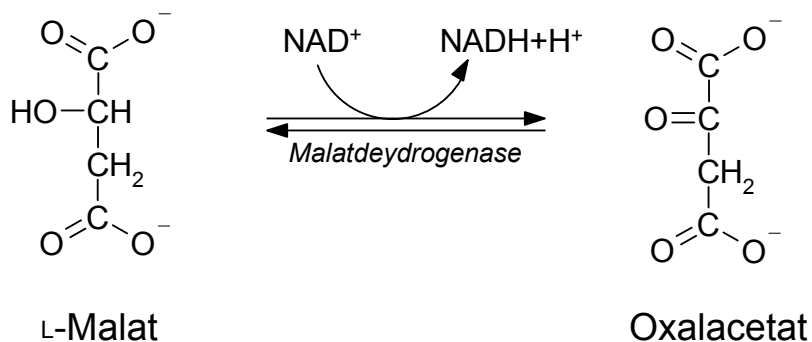
4 Biologische Aktivität

4.1 Malatdehydrogenase-inhibitorische Aktivität

4.1.1 Messprinzip

Malatdehydrogenase katalysiert die Umsetzung von Malat zu Oxalacetat (respektive die Rückreaktion) mit NAD^+ / $\text{NADH}+\text{H}^+$ als Coenzym (siehe Schema 4-1). $\text{NADH}+\text{H}^+$ zeigt ein Absorptionsmaximum bei 340 nm ($\epsilon = 6.2 \times 10^6 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Infolgedessen kann die Bildung von $\text{NADH}+\text{H}^+$ durch MDH spektralphotometrisch verfolgt werden.^{72, 73}

Schema 4-1:



Da die Bildung von $\text{NADH}+\text{H}^+$ abhängig von der Enzymaktivität der MDH ist, kann man die von der Konzentration des $\text{NADH}+\text{H}^+$ abhängige Absorption über einen bestimmten Zeitraum messen und

die daraus resultierende Umsetzungsgeschwindigkeit als ein Maß für die enzymatische Aktivität der MDH ansehen. Die Umsetzungsgeschwindigkeit berechnet sich aus der Steigung der bei der Messung erhaltenen Geraden, also dem Verhältnis $\Delta A/\Delta t$. Die Umsetzungsgeschwindigkeit, die bei der Messung ohne Zugabe eines Inhibitors ermittelt wird, entspricht der ungehemmten Enzymaktivität und kann mit 100% gleichgesetzt werden. Nach Inhibitorzugabe sinkt die Umsetzungsgeschwindigkeit, d.h. pro Zeiteinheit entsteht weniger $\text{NADH} + \text{H}^+$, woraus auch ein kleinerer Wert für die Steigung resultiert. Dieser Wert entspricht wiederum der Restaktivität des Enzyms nach Zugabe einer bestimmten Konzentration des Inhibitors. Zur Aktivität des ungehemmten Enzyms ins Verhältnis gesetzt, berechnet sich die prozentuale Restaktivität nach der Gleichung:

$$\text{Restaktivität [\%]} = \frac{\Delta A / \Delta t \text{ Probe [mAU/min]}}{\Delta A / \Delta t \text{ reine Enzymaktivität [mAU/min]}} \cdot 100\%$$

Die Aussagekraft des Wertes einer Restaktivität zur Charakterisierung eines Inhibitors ist gering, wenn diese nur bei einem Konzentrationsniveau ermittelt wurde. Die inhibitorische Aktivität einer Verbindung lässt sich exakter angeben, wenn die Restaktivitäten für verschiedene Inhibitor-Konzentrationen bestimmt werden. Die Restaktivitäten können dann graphisch gegen die jeweilige Inhibitor-Konzentration aufgetragen werden. Aus dem erhaltenen Graph lässt sich die Konzentration ablesen, bei der die Restaktivität des Enzyms gerade 50% beträgt. Diese Konzentration

wird als IC₅₀-Wert bezeichnet (IC₅₀, engl.: inhibitory concentration 50%) und charakterisiert die Hemmwirkung einer Substanz. Der IC₅₀-Wert ist allerdings von den Messbedingungen wie beispielsweise Enzymkonzentration, Substratkonzentration oder Coenzymkonzentration abhängig. Von diesen Größen unabhängig ist der K_i-Wert, der dem Massenwirkungsgesetz unterliegt. Als K_i-Wert wird die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes, auch Inhibitor-Konstante genannt, bezeichnet, der die Affinität des Inhibitors zum Enzym ausdrückt.⁷⁴ Der K_i-Wert lässt sich mit nachfolgender Formel berechnen:

$$K_i = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}$$

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das bei Meijer (CNRS, Station Biologique, Roscoff, Frankreich) entwickelte Verfahren zur Bestimmung der MDH-inhibitorischen Aktivität²² im Arbeitskreis Kunick (Universität Hamburg bzw. TU Braunschweig) für die Routineanwendung etabliert. Dazu musste zunächst die Methode auf die Spektralphotometer PU8700 (Philips Scientific) und SPECORD 200 (Analytik Jena) übertragen werden. Im Folgenden soll die Methode kurz skizziert werden, eine detaillierte Durchführungsvorschrift ist dem experimentellen Teil (Kap. 8.3.1) zu entnehmen. Die Messung erfolgt bei 25 °C in Anwesenheit von 79 mM Trizma[®]-Puffer (pH 8.5), 75 mM L-Malat und 0.8 mM NAD⁺. Die Menge der MDH-Lösung wird experimentell ermittelt und muss so gewählt werden, dass sich ein linearer Zusammenhang zwischen

der gemessenen Absorption und der Messzeit ergibt. Die Messung erfolgt in Richtung Oxidation (Malat \rightarrow Oxalacetat), wobei die Entstehung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ bei 340 nm über 2.5 Minuten verfolgt wird. Ähnliche Methoden lassen sich in der Literatur finden.^{13, 19, 72}

4.1.2 Überprüfung relevanter Messparameter

Um beurteilen zu können, ob sich das von Knockaert und Meijer et al.²² beschriebene Verfahren zur Bestimmung der MDH-Aktivität auf die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Spektralphotometer PU8700 (Philips Scientific) und SPECORD 200 (Analytik Jena) übertragen lässt, sollten die für die Messung relevanten Parameter definiert und überprüft werden. Die hier angewendete Methode lässt sich nach den ICH-Richtlinien zur Validierung von analytischen Verfahren (Q2)⁷⁵ am ehesten dem Begriff Assay zuordnen, da weder eine Qualifizierung der Komponenten noch eine Gehaltsbestimmung des Analyten im Vordergrund stehen. Die Richtlinie sieht für Assays die Überprüfung folgender Parameter vor: Richtigkeit, Präzision, Spezifität, Linearität und Messbereich.⁷⁵

Bei der Aktivitätsmessung von MDH entsteht $\text{NADH} + \text{H}^+$ in mikromolaren Mengen, $\text{NADH} + \text{H}^+$ stellt somit den Analyten dar. Für die Überprüfung der Parameter wurde kommerziell erhältliches $\text{NADH} + \text{H}^+$ (Sigma) verwendet. Da die Malatdehydrogenase eine hohe Substrat-Spezifität für L-Malat aufweist (s. Kap. 1.1), kann lediglich L-Malat durch MDH/ NAD^+ oxidiert werden. Mit dieser Methode wird ausschließlich die Entstehung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ gemessen. Das Verfahren kann für die durchzuführenden

Messungen als spezifisch angesehen werden. Der angestrebte Messbereich lag zwischen 6.0 und 35.5 μM , da die bei der Aktivitätsbestimmung der MDH erwartete Menge $\text{NADH} + \text{H}^+$ etwa in diesem Bereich liegt. Die Berechnung des erwarteten Messbereichs erfolgte über den molaren Absorptionskoeffizienten ϵ . Als Lösungsmittel wurde Trizma[®]-Puffer gewählt, da dieser bei der Aktivitätsmessung eingesetzt wird. Die Linearitätsprüfungen sowie die Ermittlungen der Gerätepräzisionen und Wiederholungspräzisionen sollen in den nächsten Unterkapiteln näher beschrieben werden.

4.1.2.1 Linearität

Die Linearität einer analytischen Methode beschreibt den direkten proportionalen Zusammenhang zwischen der Probenkonzentration und dem Messsignal innerhalb des definierten Messbereichs.⁷⁵

Die Bestimmung der Linearität und deren Beurteilung erfolgte in Anlehnung an die von Kromidas beschriebene Vorgehensweise.⁷⁶

Es wurden zunächst fünf Konzentrationsniveaus festgelegt und anschließend drei Messungen je Konzentration und Lösung durchgeführt. Für jedes Konzentrationsniveau wurden drei separate Lösungen (unabhängige Einwaagen) hergestellt.

Die Linearitätsbestimmung erfolgte in folgenden Schritten:

Ermittlung der Kalibrierfunktion durch Vergleich der Kenngrößen: Ordinatenabschnitt, Steigung, Korrelationskoeffizient, Bestimmtheitsmaß, Reststandardabweichung, Verfahrensstandardabweichung und relative Verfahrensstandardabweichung.

Folgende mathematische Modelle kommen als geeignete Kalibrierfunktionen in Frage:

a) lineare Regression: $y = a + bx$

mit: a = Ordinatenabschnitt; b = lineare Steigung

oder

b) quadratische Regression: $y = a + bx + cx^2$

mit: a = Ordinatenabschnitt; b = lineare Steigung;
 c = quadratische Steigung

Das mathematische Modell soll den Zusammenhang zwischen Signal und Konzentration möglichst genau beschreiben. Dazu sollten die charakteristischen Kenngrößen genauer betrachtet werden.

- Die Steigung b ist ein Maß für die Empfindlichkeit einer Methode. Je größer die Steigung, um so empfindlicher ist

die Methode und desto leichter können kleine Konzentrationsunterschiede noch festgestellt werden.

- Der Ordinatenabschnitt a ist im Idealfall gleich 0, d. h., dass bei einer Konzentration von 0 auch kein Signal zu messen ist. Wenn ein Signal für die Konzentration 0 zu messen ist, stellt dieser Wert einen konstanten systematischen Fehler dar und sollte als Blindwert bei einer Konzentrationsbestimmung einbezogen werden.
- Der Korrelationskoeffizient r ist ein notwendiges, aber nicht maßgebendes Kriterium für die Linearität. Er beschreibt die Korrelation von x- und y-Werten, die durch die betrachtete mathematische Funktion beschrieben wird. Ein großer Wert für r bedeutet, dass große x-Werte zu großen y-Werten führen und kleine x-Werte jeweils zu kleinen y-Werten.

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\left\{ \left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{\frac{1}{2}}}$$

- Das Bestimmtheitsmaß R^2 wird durch die Quadrierung von r erhalten. Unterschiede in der Korrelation von x- und y-Werten werden stärker sichtbar, d. h., dass R^2 ein Maß für den Grad der Abhängigkeit zwischen x- und y-Werten ist, das darüber Auskunft gibt, wie eng sich die gemessenen Punkte um die Regressionsgerade scharen. Ist $R^2 = 1$,

hängt y immer nur von x ab, und es resultiert ein absolut linearer Zusammenhang.

- Die Reststandardabweichung s_y ist die Streuung der Messwerte um die Regressionsgerade. Sie stellt ein Präzisionsmaß für die Messung dar.

- für lineare Regression:

$$s_{yL} = \sqrt{\left[\frac{Q_{xx} - \frac{Q_{xy}^2}{Q_{xx}}}{N-2} \right]}$$

mit: N = Anzahl der Messungen; L = Linear

Berechnung der Quadratsummen:

$$Q_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$$

$$Q_{xy} = \sum x_i \cdot y_i - \frac{(\sum y_i) \cdot (\sum x_i)}{N}$$

- für quadratische Regression:

$$s_{yQ} = \sqrt{\frac{\sum y_i^2 - a \cdot \sum y_i - b \cdot \sum (x_i \cdot y_i) - n \cdot \sum (x_i^2 \cdot y_i)}{N-3}}$$

mit: Q = Quadratisch

Die Reststandardabweichung sollte üblicherweise unter 1.5-2.0% liegen.⁷⁶

- Die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} ist ein Maß für die Leistungsfähigkeit der Methode. Sie errechnet sich durch Normierung der Reststandardabweichung auf die Mitte des Arbeitsbereiches, also durch die Division der Reststandardabweichung durch die Empfindlichkeit.

- für lineare Regression:

$$s_{x0L} = \frac{s_y}{b}$$

mit: b = Steigung der linearen Regression

- für quadratische Regression:

$$s_{x0Q} = \frac{s_y}{E}$$

mit: E = Empfindlichkeit ($E = b + 2 \cdot n \cdot \bar{x}$)

- Die relative Verfahrensstandardabweichung bzw. der Verfahrensvariationskoeffizient V_{k0} ist eine Normierungsgröße, welche die Möglichkeit bietet, verschiedene Methoden miteinander zu vergleichen. Sie ist ein wichtiges Gütekriterium der Methode.

$$V_{k0} = \frac{s_{x0}}{x} \cdot 100\%$$

mit: x = Konzentration in der Mitte des Konzentrationsbereichs

Ergibt sich nach der Überprüfung der zuvor beschriebenen Größen, dass die quadratische Regression das geeignetere mathematische Modell für die experimentell gefundene Abhängigkeit von Signal und Konzentration ist, kann mit dem Anpassungstest nach Mandel (modifizierter F-Test) errechnet werden, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den erhaltenen Reststandardabweichungen der zu vergleichenden mathematischen Modelle vorliegt.

- Aus den Reststandardabweichungen wird die Differenz der Abweichungsvarianzen DS^2 berechnet:

$$DS^2 = (N-2) \cdot s_{y1}^2 - (N-3) \cdot s_{y2}^2$$

mit: DS^2 : Differenz der Abweichungsvarianzen
 s_{y1} : Reststandardabweichung der lin. Funktion
 s_{y2} : Reststandardabweichung der quadr. Funktion
 N : Anzahl der Messungen (Anzahl der Konz.), bei Doppel- oder Dreifachbestimmung Anzahl der Mittelwerte

- Anschließend wird der Prüfwert PW berechnet:

$$PW = \frac{DS^2}{s_{y2}^2}$$

und mit dem Tabellenwert aus der F-Tabelle (Freiheitsgrad $f_1 = 1, f_2 = N-3, P = 95 \%$) verglichen. Wenn $PW \leq F$, ist die Kalibrierfunktion linear.

Ergebnisse der Linearitätsprüfungen:

- PU8700 (Philips Scientific):

Tabelle 4-1: Linearitätsprüfung für das PU 8700.

Messwerte:

Konz. [µM]	Absorption [mAU]			
x-Werte	f(x)-Werte			
	1.Messung	2.Messung	3.Messung	Mittelwert
6,6	33.0	33.0	33.0	33.0
6.1	32.0	32.0	34.0	32.7
6.2	33.0	32.0	33.0	32.7
12.5	65.0	65.0	65.0	65.0
12.3	63.0	64.0	63.0	63.3
11.8	67.0	66.0	66.0	66.3
19.4	94.0	93.0	94.0	93.7
19.0	95.0	94.0	94.0	94.3
18.7	91.0	91.0	91.0	91.0
25.3	128.0	129.0	129.0	128.7
25.0	123.0	121.0	121.0	121.7
24.7	124.0	124.0	124.0	124.0
35.2	174.0	177.0	177.0	176.0
35.4	178.0	178.0	177.0	177.7
35.1	174.0	174.0	174.0	174.0

Für die Erstellung der Kalibriergeraden (Abbildung 4-1) wurden die Mittelwerte verwendet.

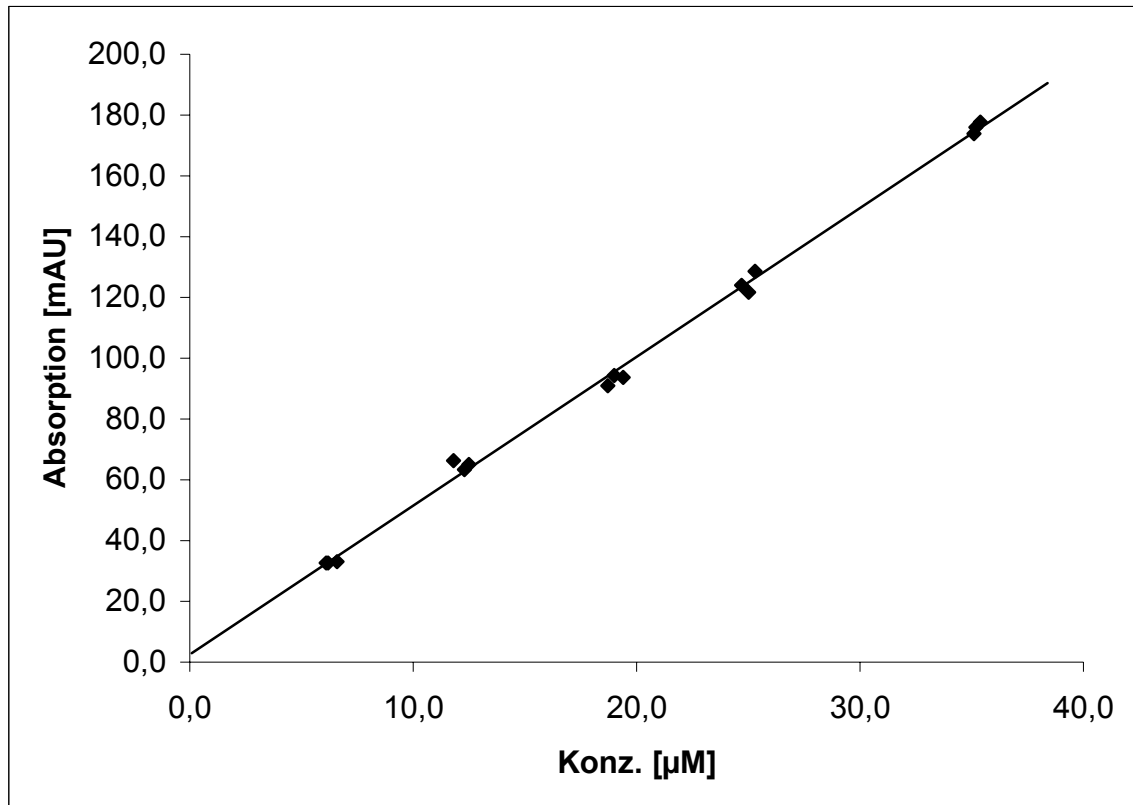
- Daten der linearen Regression:

Arbeitsmitte x :	19.6
Anzahl der Kalibrierpunkte N :	15
Steigung b :	4.9
Ordinatenabschnitt a :	2.5
Korrelationskoeffizient r :	0.9981
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0.9962
Reststandardabweichung s_y :	3.23
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0.66
Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{k0} :	3.37%

- Daten der quadratischen Regression:

Quadratische Steigung c :	0.0
Lineare Steigung b :	4.7
Ordinatenabschnitt a :	4.5
Korrelationskoeffizient r :	0.9982
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0.9964
Reststandardabweichung s_y :	3.31
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0.68
Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{k0} :	3.47%

Abbildung 4-1: Graphische Darstellung der linearen Regression für das PU 8700.



Bewertung:

Visuell sind bei der Auftragung der Absorptionswerte gegen die Konzentration (Abb. 4-1) keine deutlichen Abweichungen von der resultierenden Geraden festzustellen. Da die Werte der linearen Regression besser sind als die der quadratischen Regression, ist die lineare Regression das geeignetere mathematische Modell. Als Akzeptanzkriterien gelten ein Korrelationskoeffizient $r > 0.999$, ein y-Achsenabschnitt $a < 0.5\%$ der Zielkonzentration und eine Reststandardabweichung $s_y < 1.5\text{--}2.0\%$.⁷⁶ Der Korrelationskoeffizient der linearen Korrelation liegt mit $r = 0.9981$ nahe am geforderten Wert.

Setzt man die höchste vermessene Konzentration mit der Zielkonzentration gleich, sollte der y-Achsenabschnitt a bei maximal 8.7 mAU liegen. Dieser Wert wird sogar unterschritten. Die Reststandardabweichung liegt mit 3.31% etwas zu hoch. Da allerdings außerhalb des linearen Lambert-Beerschen Bereichs gearbeitet wird, ist dieser Wert akzeptabel. Es sei darauf hingewiesen, dass durch die Komplexität der eigentlichen Messung hier lediglich die gerätebedingte Messlinearität überprüft werden konnte. Einflüsse, die durch das biologische Testsystem begründet sind und die Linearität des Systems ebenfalls maßgeblich beeinflussen können, wurden bei dieser Prüfung nicht erfasst.

- SPECORD 200 (Analytik Jena):

Tabelle 4-2: Linearitätsprüfung für das SPECORD 200.

Messwerte:	Konz. [μM]	Absorption [mAU]			
	x-Werte	f(x)-Werte			
		1.Messung	2.Messung	3.Messung	Mittelwert
	6.5	27.6	27.2	26.4	27.1
	6.4	27.9	27.7	28.0	27.9
	12.5	53.9	53.1	53.1	53.4
	12.5	56.5	55.8	55.1	55.8
	12.6	53.2	52.1	52.8	52.7
	18.9	80.7	79.6	80.2	80.2
	18.7	81.5	80.6	80.4	80.8
	19.0	87.8	85.9	86.7	86.8
	25.0	103.5	104.4	102.7	103.5
	25.2	111.3	111.5	111.1	111.3
	25.1	107.6	107.4	107.1	107.4
	34.9	150.9	150.1	149.4	150.1
	35.2	155.5	154.3	154.3	154.7
	34.8	149.0	149.6	148.2	148.9

Für die Erstellung der Kalibriergeraden (Abbildung 4-2) wurden die Mittelwerte verwendet.

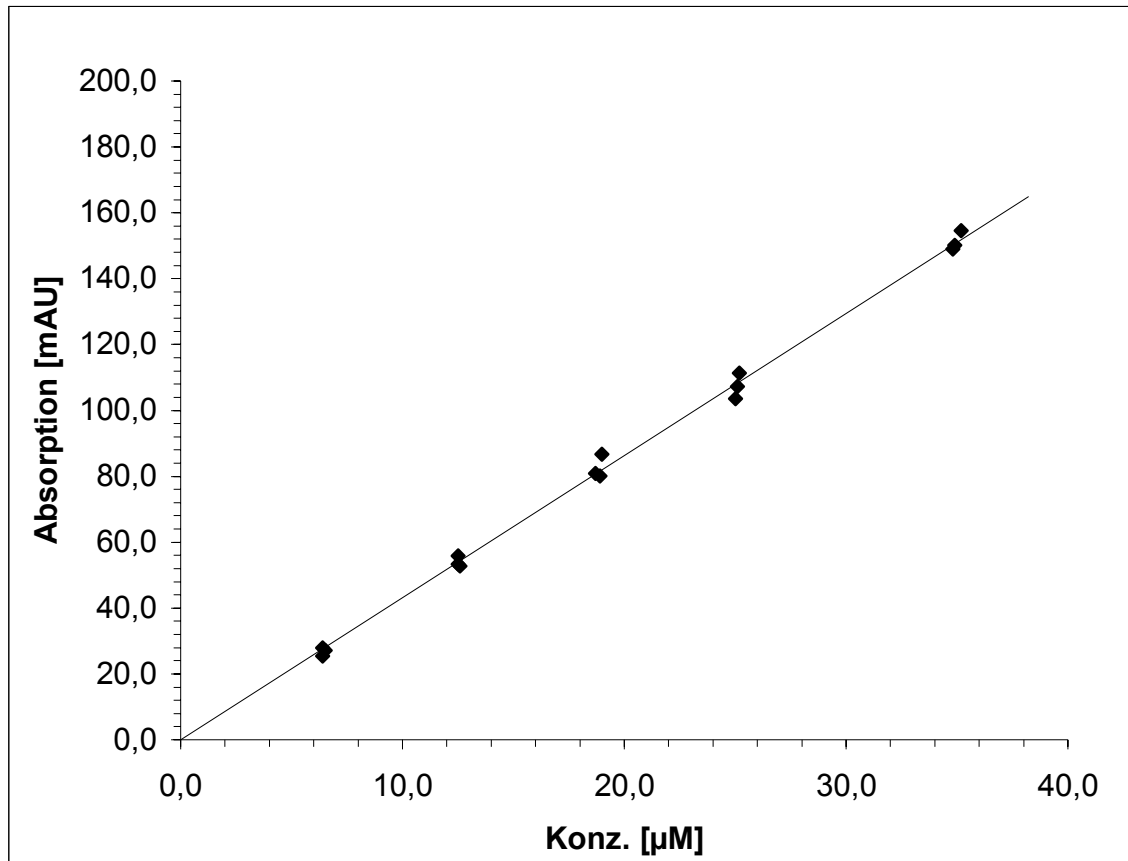
- Daten der linearen Regression:

Arbeitsmitte x :	19.6
Anzahl der Kalibrierpunkte N :	15
Steigung b :	4.3
Ordinatenabschnitt a :	-0.6
Korrelationskoeffizient r :	0.9987
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0.9974
Reststandardabweichung s_y :	2.35
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0.54
Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{k0} :	2.76%

- Daten der quadratischen Regression:

Quadratische Steigung c :	0.0
Lineare Steigung b :	4.4
Ordinatenabschnitt a :	-1.4
Korrelationskoeffizient r :	0.9987
Bestimmtheitsmaß R^2 :	0.9974
Reststandardabweichung s_y :	2.44
Verfahrensstandardabweichung s_{x0} :	0.56
Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{k0} :	2.86%

Abbildung 4-2: Graphische Darstellung der linearen Regression für das SPECORD 200.



Bewertung:

Visuell sind bei der Auftragung der Absorptionswerte gegen die Konzentration (Abb. 4-2) keine deutlichen Abweichungen von der resultierenden Geraden festzustellen. Die Bewertung der einzelnen Größen kann analog zu der oben beschriebenen Weise erfolgen. Auch in diesem Fall liefert die lineare Regression die besseren Werte und kann als mathematisches Modell angewendet werden. Der Korrelationskoeffizient liegt nahezu bei 0.999 (hier: 0.9987) und der y-Achsenabschnitt ist mit -0.6 innerhalb des geforderten

Bereichs. Die Reststandardabweichung ist mit 2.35% ebenfalls in der Nähe des geforderten Bereichs und die Messlinearität im Messbereich von 6.0-35.5 µM somit nachgewiesen.

4.1.2.2 Präzision

Die Präzision ist das Maß für die Übereinstimmung unabhängiger Analyseenergebnisse, d. h. für die Reproduzierbarkeit. Sie wird als Streuparameter bezeichnet und gibt den Grad der Streuung einzelner Werte um den Mittelwert \bar{x} an. Die Kenngrößen für die Präzision sind die Standardabweichung s und die relative Standardabweichung s_{rel} , die auch als Variationskoeffizient V_K bezeichnet wird.⁷⁵

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \qquad s_{rel} = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

mit: x_i : Einzelwert
 \bar{x} : Mittelwert
 n : Anzahl der Messungen
 s : Standardabweichung
 s_{rel} : relative Standardabweichung

In Anlehnung an die von Kromidas beschriebene Vorgehensweise wurde zunächst jeweils die Messpräzision unter Wiederholbedingungen und anschließend die Methodenpräzision unter Wiederholbedingungen bestimmt.⁷⁷ Die Messpräzision unter Wiederholbedingungen gibt die Abweichung wieder, die durch das Gerät selbst resultiert. Die Methodenpräzision unter Wiederholbedingungen gibt die Abweichungen, die im gesamten Analysenverfahren (Probenaufbereitung, Messung, Auswertung etc.) begründet liegen, wieder. Bei biologischen Testsystemen gibt es häufig große Schwankungen zwischen einzelnen Testungen, und Abweichungen von ca. 10% sind nicht selten. Für das hier beschriebene Messverfahren sollte die Methodenpräzision unter Wiederholbedingungen bestimmt werden, um abschätzen zu können, in welchem Rahmen die hier erhaltenen Messwerte streuen.

- PU 8700 (Philips Scientific):

1. Gerätepräzision:

Eine 18.7 μM NADH+H⁺-Lösung wurde zehnfach bei 340 nm in jeweils frischen Küvetten vermessen.

Tabelle 4-3: Messpräzision PU 8700 (18.7 μM).

Messwerte:	Messung	Absorption
	1	0.095
	2	0.094
	3	0.096
	4	0.094
	5	0.093
	6	0.092
	7	0.093
	8	0.092
	9	0.094
	10	0.094

Statistische Größen:

Anzahl der Messungen n :	10
Kleinsten Wert (Min):	0.092
Größten Wert (Max):	0.096
Mittelwert \bar{x} :	0.094
Standardabweichung s :	0.001
Relative Standardabweichung s_{rel} :	1.34%
Vertrauensbereich VB von \bar{x} ($P = 95\%$):	0.094 ± 0.00072

Die Messwerte werden durch den David-Test auf Normalverteilung überprüft. Liegt die errechnete Prüfgröße PG mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit innerhalb der von David vorgegebenen Grenzen, sind die Werte normalverteilt.

David-Test:

$$PG = \frac{R}{s} = \frac{Max - Min}{s}$$

mit: R = Spannweite; s = Standardabweichung

Für $P = 95\%$ und $n = 10$ lassen sich aus der Tabelle nach David für g_u (untere Grenze) und g_o (obere Grenze) folgende Werte ablesen:

$$g_u = 2.67 \text{ und } g_o = 4.24$$

Die errechnete Prüfgröße PG beträgt 4.0 und liegt somit innerhalb der Grenzen, mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% liegt eine Normalverteilung vor.

2. Methodenpräzision:

Die enzymatische Aktivität der mMDH wurde zehnfach nach der zuvor beschriebenen Methode gemessen.

Tabelle 4-4: Methodenpräzision PU 8700.

Messwerte:	Messung	MDH-Aktivität [mAU x min ⁻¹]
	1	59.5
	2	55.1
	3	69.7
	4	58.2
	5	65.3
	6	63.8
	7	66.2
	8	60.2
	9	60.6
	10	55.9

Statistische Größen:

Anzahl der Messungen n :	10
Kleinster Wert (Min):	55.1
Größter Wert (Max):	69.7
Mittelwert \bar{x} :	61.5
Standardabweichung s :	4.70
Relative Standardabweichung s_{rel} :	7.65%
Vertrauensbereich VB von \bar{x} ($P = 95\%$):	61.5 ± 3.36

Die Messwerte werden durch den David-Test auf Normalverteilung überprüft.

David-Test:

$$PG = \frac{R}{s} = \frac{Max - Min}{s}$$

mit: R = Spannweite; s = Standardabweichung

Für $P = 95\%$ und $n = 10$ lassen sich aus der Tabelle nach David für g_u (untere Grenze) und g_o (obere Grenze) folgende Werte ablesen:

$$g_u = 2.67 \text{ und } g_o = 4.24$$

Die errechnete Prüfgröße PG beträgt 3.11 und liegt somit innerhalb der Grenzen, mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% liegt eine Normalverteilung vor.

- SPECORD 200 (Analytik Jena):

1. Messpräzision:

Eine 6.4 μM und eine 34.9 μM NADH+H⁺-Lösung wurden jeweils zehnfach bei 340 nm in jeweils frischen Küvetten vermessen. In diesem Fall wurden die niedrigste und die höchste Konzentration gewählt, um beurteilen zu können, wie sich die Messpräzision im gesamten Messbereich verhält.

Tabelle 4-5: Messpräzision SPECORD 200 (6.4 µM).

Messwerte:	Messung	Absorption
	1	0.0265
	2	0.0254
	3	0.0246
	4	0.0271
	5	0.0260
	6	0.0242
	7	0.0249
	8	0.0248
	9	0.0247
	10	0.0243

Statistische Größen:

Anzahl der Messungen n :	10
Kleinsten Wert (Min):	0.0242
Größten Wert (Max):	0.0271
Mittelwert \bar{x} :	0.0253
Standardabweichung s :	0.0010
Relative Standardabweichung s_{rel} :	3.88%
Vertrauensbereich VB von \bar{x} ($P = 95\%$):	0.0253 ± 0.00072

Die Messwerte werden durch den David-Test auf Normalverteilung überprüft.

David-Test:

$$PG = \frac{R}{s} = \frac{Max - Min}{s}$$

mit: R = Spannweite; s = Standardabweichung

Für $P = 95\%$ und $n = 10$ lassen sich aus der Tabelle nach David für g_u (untere Grenze) und g_o (obere Grenze) folgende Werte ablesen:

$$g_u = 2.67 \text{ und } g_o = 4.24$$

Die errechnete Prüfgröße PG beträgt 2.9 und liegt somit innerhalb der Grenzen, mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% liegt eine Normalverteilung vor.

Tabelle 4-6: Messpräzision SPECORD 200 (34.9 µM).

Messwerte:	Messung	Absorption
	1	0.1509
	2	0.1501
	3	0.1494
	4	0.1495
	5	0.1505
	6	0.1497
	7	0.1498
	8	0.1501
	9	0.1498
	10	0.1498

Statistische Größen:

Anzahl der Messungen n :	10
Kleinsten Wert (Min):	0.1494
Größten Wert (Max):	0.1509
Mittelwert \bar{x} :	0.1500
Standardabweichung s :	0.0005
Relative Standardabweichung s_{rel} :	0.31%
Vertrauensbereich VB von \bar{x} ($P = 95\%$):	0.150 ± 0.00072

Die Messwerte werden durch den David-Test auf Normalverteilung überprüft.

David-Test:

$$PG = \frac{R}{s} = \frac{Max - Min}{s}$$

mit: R = Spannweite; s = Standardabweichung

Für $P = 95\%$ und $n = 10$ lassen sich aus der Tabelle nach David für g_u (untere Grenze) und g_o (obere Grenze) folgende Werte ablesen:

$$g_u = 2.67 \text{ und } g_o = 4.24$$

Die errechnete Prüfgröße PG beträgt 3.0 und liegt somit innerhalb der Grenzen, mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% liegt eine Normalverteilung vor.

2. Methodenpräzision:

Die enzymatische Aktivität der mMDH wurde zehnfach nach der zuvor beschriebenen Methode gemessen.

Tabelle 4-7: Methodenpräzision SPECORD 200.

Messwerte:	Messung	MDH-Aktivität [mAU x min ⁻¹]
	1	64.1
	2	65.8
	3	64.6
	4	61.6
	5	59.6
	6	62.7
	7	61.9
	8	65.6
	9	63.7
	10	65.9

Statistische Größen:

Anzahl der Messungen n :	10
Kleinsten Wert (Min):	59.6
Größter Wert (Max):	65.9
Mittelwert \bar{x} :	63.6
Standardabweichung s :	2.08
Relative Standardabweichung s_{rel} :	3.28%
Vertrauensbereich VB von \bar{x} ($P = 95\%$):	63.6 ± 1.49

Die Messwerte werden durch den David-Test auf Normalverteilung überprüft.

David-Test:

$$PG = \frac{R}{s} = \frac{Max - Min}{s}$$

mit: R = Spannweite; s = Standardabweichung

Für $P = 95\%$ und $n = 10$ lassen sich aus der Tabelle nach David für g_u (untere Grenze) und g_o (obere Grenze) folgende Werte ablesen:

$$g_u = 2.67 \text{ und } g_o = 4.24$$

Die errechnete Prüfgröße PG beträgt 3.11 und liegt somit innerhalb der Grenzen, mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% liegt eine Normalverteilung vor.

Abschließende Bewertung:

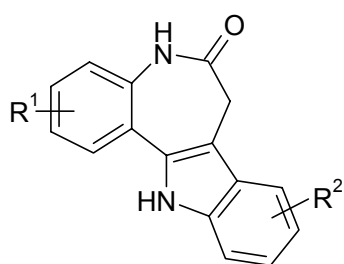
Für photometrische Bestimmungen sollte der Wert für die relative Standardabweichung der Messpräzision unter 1% liegen.⁷⁷ Da außerhalb des Lambert-Beerschen Bereichs gearbeitet wird, liegen die erwarteten sowie die erhaltenen Werte oberhalb dieses Bereichs. Es ist nicht überraschend, dass die Werte für die relative Standardabweichung mit geringerer Konzentration steigen und somit die Präzision sinkt. Da für die Methodenpräzision ein Wert für die relative Standardabweichung von bis zu 10% erwartet wurde, liegt der Wert für die relative Standardabweichung mit 3.28%

(SPECORD 200) für die Methodenpräzision überraschend niedrig. Auch eine relative Standardabweichung von 7.65% (PU 8700) erscheint durchaus akzeptabel. Die gerätebedingte Messlinearität konnte für den Messbereich von 6.0-35.5 μM nachgewiesen werden. Wie bereits erwähnt, werden Einflüsse, die durch das biologische Testsystem begründet sind und die Linearität des Systems ebenfalls maßgeblich beeinflussen können, bei der durchgeführten Linearitätsprüfung nicht erfasst. Da mit dieser Methode ausschließlich die Entstehung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ gemessen wird, kann das Verfahren als spezifisch angesehen werden. Die Richtigkeit der Methode konnte nicht überprüft werden, da keine Alternativmethode zur Bestimmung der Malatdehydrogenase-Inhibition als Vergleich zur Verfügung stand. Dennoch kann die Methode als qualifiziert angesehen und für die Routinetestung MDH-inhibitorischer Aktivität angewendet werden.

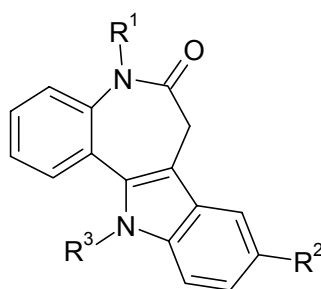
4.1.3 Testung der Paullone

Um einen Überblick über die MDH-inhibitorische Aktivität der Paullone (**2**) zu erhalten, sollte zunächst eine Vielzahl verschiedener Paullone in einer Übersichtsmessung getestet werden. Im Rahmen dieser wurde zunächst die Restaktivität der mMDH bei Anwesenheit von 10 μM des zu untersuchenden Paullons bestimmt (Tabelle 4-8). Anschließend wurden von einer Auswahl dieser Paullone die IC_{50} -Werte (Tabelle 4-9) ermittelt, mit deren Hilfe Struktur-Aktivitätsbeziehungen hergeleitet werden sollten.

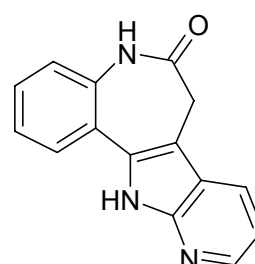
Die in dieser Arbeit untersuchten Paullone wurden bereits im Rahmen anderer Dissertationen im Arbeitskreis Kunick erschlossen oder waren bereits veröffentlicht.^{29, 55, 56, 65, 78}



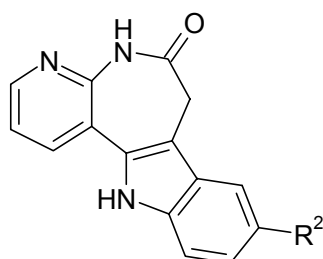
2



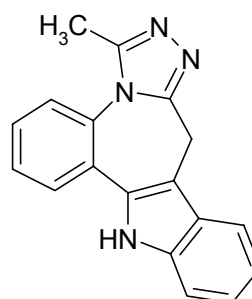
48



49



50



51

Tabelle 4-8: Restaktivität der mMDH $\pm s_M$ [%] bei Anwesenheit verschiedener Paullone [10 μ M].

	R¹	R²	R³	Restaktivität mMDH $\pm s_M$ [%]^{a,b}
2a	H	9-Br	-	74.5 \pm 0.6
2b	H	9-NO ₂	-	54.2 \pm 3.1
2d	H	H	-	78.7 \pm 4.0
2e	H	9-Cl	-	73.4 \pm 4.3
2f	H	9-F	-	46.2 \pm 5.4
2g	H	9-CF ₃	-	88.3 \pm 0.9
2h	H	9-CN	-	91.3 \pm 5.5
2i	H	9-CH ₃	-	87.8 \pm 7.4
2j	H	9-COOH	-	98.7 \pm 0.6
2k	H	9-COOCH ₃	-	60.9 \pm 3.1
2l	H	9-COOC ₂ H ₅	-	59.6 \pm 2.0
2m	H	9-COO-n-C ₃ H ₇	-	38.7 \pm 2.6
2n	H	9-COO-n-C ₄ H ₉	-	37.8 \pm 4.5
2o	H	9-COO-n-C ₅ H ₁₁	-	12.1 \pm 4.9
2p	H	9-COO-n-C ₆ H ₁₃	-	6.3 \pm 3.2
2q	H	9-COO-n-C ₈ H ₁₇	-	5.2 \pm 1.3
2r	H	9-SCH ₃	-	76.6 \pm 1.0
2s	H	9-SOCH ₃	-	96.2 \pm 1.3
2t	H	9-SO ₂ NH ₂	-	89.3 \pm 3.0
2u	H	9-CONHCH ₂ -pOCH ₃ -Ph	-	55.2 \pm 0.8
2v	2-(CH ₂) ₂ CN	9-CF ₃	-	20.8 \pm 3.5
2w	2-CH=CHCOCH ₃	9-CF ₃	-	23.6 \pm 2.6
2aa	2,3-di-OCH ₃	9-CF ₃	-	97.7 \pm 0.9
2bb	3-OCH ₃	9-CF ₃	-	83.9 \pm 1.4
2cc	2,3-di-OCH ₃	9-Br	-	56.3 \pm 2.6

Tabelle 4-8: Restaktivität der mMDH $\pm s_M$ [%] bei Anwesenheit verschiedener Paullone [10 μ M] - Fortsetzung.

	R¹	R²	R³	Restaktivität mMDH $\pm s_M$ [%]^{a, b}
2dd	2-OCH ₃	9-Br	-	58.7 \pm 3.0
2ee	3-OH	9-Br	-	15.0 \pm 8.0
2ff	4-OCH ₃	9-Br	-	82.0 \pm 0.1
2gg	4-OH	9-Br	-	25.9 \pm 3.9
2hh	2,3-di-OCH ₃	9-CN	-	89.2 \pm 2.7
2ii	4-OCH ₃	H	-	87.6 \pm 3.1
2jj	H	11-Cl	-	65.3 \pm 3.1
2kk	H	8,10-di-Cl	-	28.7 \pm 3.0
48a	Benzyl	Br	H	8.6 \pm 0.6
48b	CH ₃	Br	H	81.9 \pm 0.6
48c	H	Br	CH ₂ CH=CH ₂	74.1 \pm 0.0
48d	H	H	CH ₃	98.0 \pm 1.1
49	-	-	-	75.5 \pm 1.2
50	-	Cl	-	50.6 \pm 2.9
51	-	-	-	96.1 \pm 0.2

^a Die Messungen erfolgten am PU 8700 Series Spektralphotometer. Die angegebenen Werte resultierten aus den Mittelwerten aus zwei an unterschiedlichen Tagen durchgeführten Dreifachbestimmungen.

^b $s_M = SEM = s/\sqrt{N}$ (SEM, engl.: Standard Error of the Mean; Standardfehler des Mittelwerts).⁷⁹

Die Übersichtsmessungen deuteten darauf hin, dass insbesondere Paullone mit lipophilen Resten (**2o**, **2p**, **2q** und **48a**) mMDH hemmen. Diese Beobachtung deckte sich mit den in Kapitel 1.3.1 beschriebenen Ergebnissen.¹³⁻²⁰ Besonders interessant war in diesem Zusammenhang, dass sich die Substitution am Lactam-Stickstoff im Fall von Verbindung **48a** im Vergleich zu Kenpaullon (**2a**) positiv auszuwirken scheint. Die Substitution am Indol-Stickstoff (**48c** und **48d**) scheint im Vergleich mit Kenpaullon (**2a**) jedoch keinen Effekt zu haben. Schultz konnte im Rahmen ihrer Dissertation zeigen, dass sich alle Substitutionen am Lactam- und am Indol-Stickstoff negativ auf die CDK-inhibitorische Aktivität der Paullone auswirken.⁵⁶ Weiterhin auffällig waren die geringen Restaktivitäten der mMDH bei Anwesenheit der Paullone **2ee** und **2gg**, die eine Hydroxylgruppe an Ring A tragen sowie die Ergebnisse der 2,9-disubstituierten Paullone **2v** und **2w**. Besonders die Gruppe der Carbonsäureester (**2k-2q**) hob sich aus der Gesamtheit hervor. Obwohl die Carbonsäure **2j** bei der Konzentration von 10 μ M keine Hemmung der mMDH zeigte, konnte bereits bei dem Methylester **2k** eine Hemmung festgestellt werden. Die inhibitorische Wirkung steigt innerhalb der Gruppe mit zunehmender Lipophilie. Die zuvor getroffenen Aussagen basieren lediglich auf den Ergebnissen der Übersichtsmessungen und sollten über IC₅₀-Werte überprüft werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst nur eine Gruppe 9-substituierter Paullone (**2**) auf ihre MDH-inhibitorische Wirkung über die Ermittlung ihrer IC₅₀-Werte (Tabelle 4-9) näher untersucht werden.

Tabelle 4-9: mMDH-inhibitorische Aktivität 9-substituierter Paullone, IC₅₀-Werte ± s_M [μM].^{a, b}

	R²	PU 8700	SPECORD 200
2q	COOC ₈ H ₁₇	2.1 ± 0.0	2.7 ± 0.2
2p	COOC ₆ H ₁₃	2.6 ± 0.7	4.3 ± 0.2
2o	COOC ₅ H ₁₁	3.0 ± 0.1	4.4 ± 0.6
2b	NO ₂	5.1 ± 0.1	5.4 ± 0.3
2m	COOC ₃ H ₇	5.0 ± 0.4	6.2 ± 0.2
2n	COOC ₄ H ₉	6.2 ± 0.5	9.9 ± 0.3
2k	COOCH ₃	6.5 ± 0.1	13.5 ± 2.0
2l	COOC ₂ H ₅	8.0 ± 0.7	20.0 ± 0.8
2a	Br	14.4 ± 0.8	20.6 ± 1.2
2f	F	-	21.8 ± 1.2
2d	H	-	26.6 ± 3.4
2e	Cl	-	39.5 ± 2.0
2r	SCH ₃	18.0 ± 0.4	41.3 ± 0.2
2g	CF ₃	26.6 ± 0.9	46.1 ± 1.4

^a Die IC₅₀-Werte wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism[®] Version 4.00 errechnet.⁸⁰

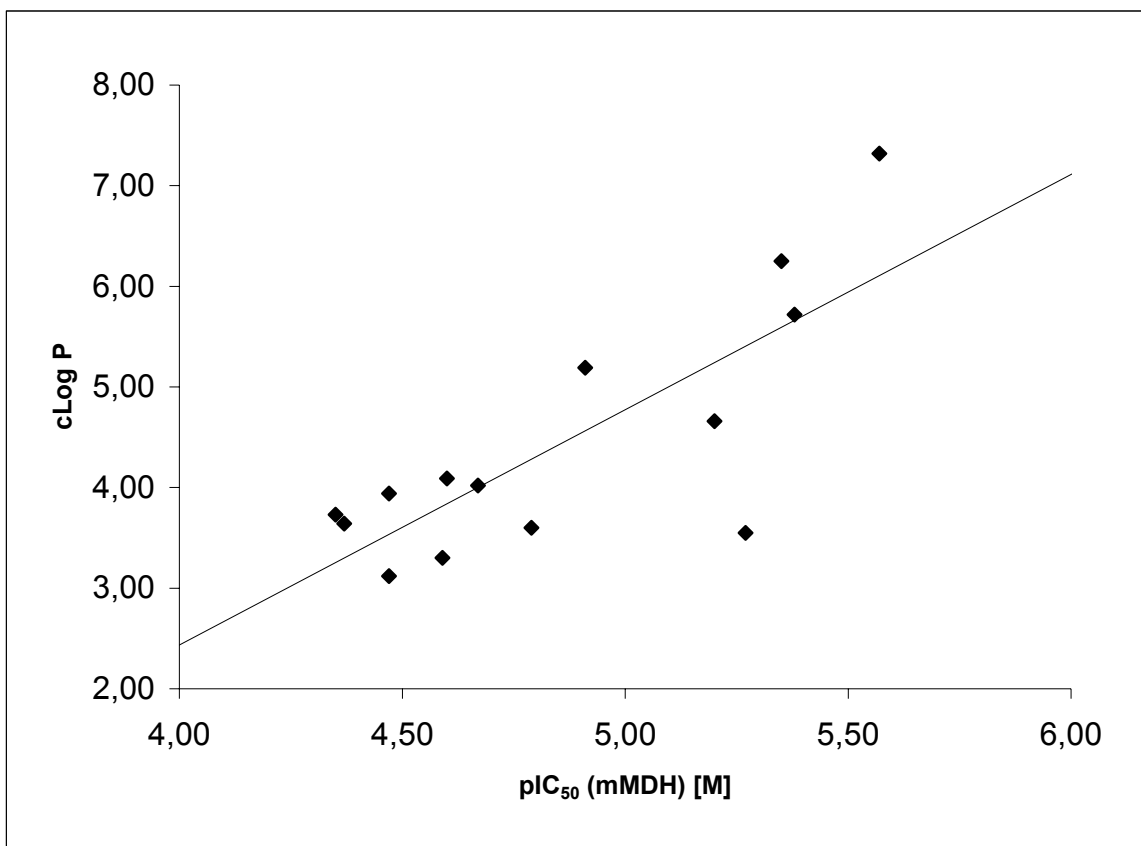
^b s_M = SEM = s/√N (SEM, engl.: Standard Error of the Mean; Standardfehler des Mittelwerts).⁷⁹

Im Folgenden sollen die am SPECORD 200 Spektralphotometer erhaltenen Werte betrachtet werden.

Die IC₅₀-Werte bestätigten die aus den Übersichtsmessungen erhaltenen Ergebnisse. Klare Struktur-Aktivitätsbeziehungen ließen sich jedoch aus der in dieser Arbeit untersuchten Gruppe der Paullone nicht herleiten. Auffällig waren allerdings auch in diesem

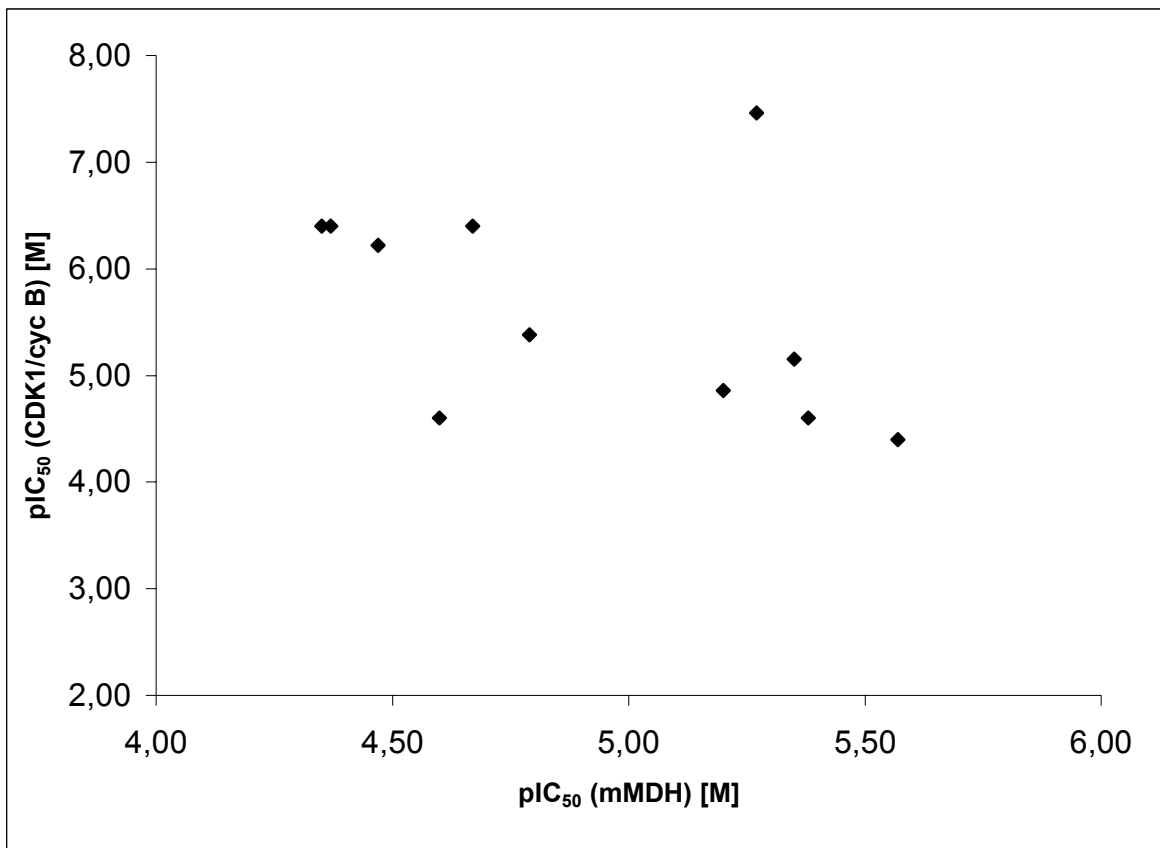
Fall die Carbonsäureester (**2k-2q**), deren Aktivität gegenüber mMDH mit steigender Lipophilie zunahm. Desweiteren zeigte lediglich Alsterpaullon **2b** eine den Estern gleichkommende gute Hemmung. Für die Gruppe der 9-substituierten Paullone ließ sich eine Korrelation ($r = 0.7895$) zwischen der mMDH-Inhibition (pIC_{50}) und der Lipophilie (cLogP) postulieren (Abbildung 4-3). Eine Korrelation zwischen der CDK1-inhibitorischen Aktivität und der mMDH-Inhibition konnte hingegen nicht festgestellt werden (Abbildung 4-4).

Abbildung 4-3: Zusammenhang zwischen der kalkulierten Lipophilie (cLogP)^a und der mMDH-inhibitorischen Aktivität (pIC_{50} [M]) der 9-substituierten Paullone.



^a Die cLogP-Werte wurden mit dem ACD Labs-Programm „LogP data base“ berechnet.

Abbildung 4-4: CDK1/Cyclin B-Hemmung (pIC_{50} [M]) und mMDH-inhibitorische Aktivität (pIC_{50} [M]) bei 9-substituierten Paullonen.

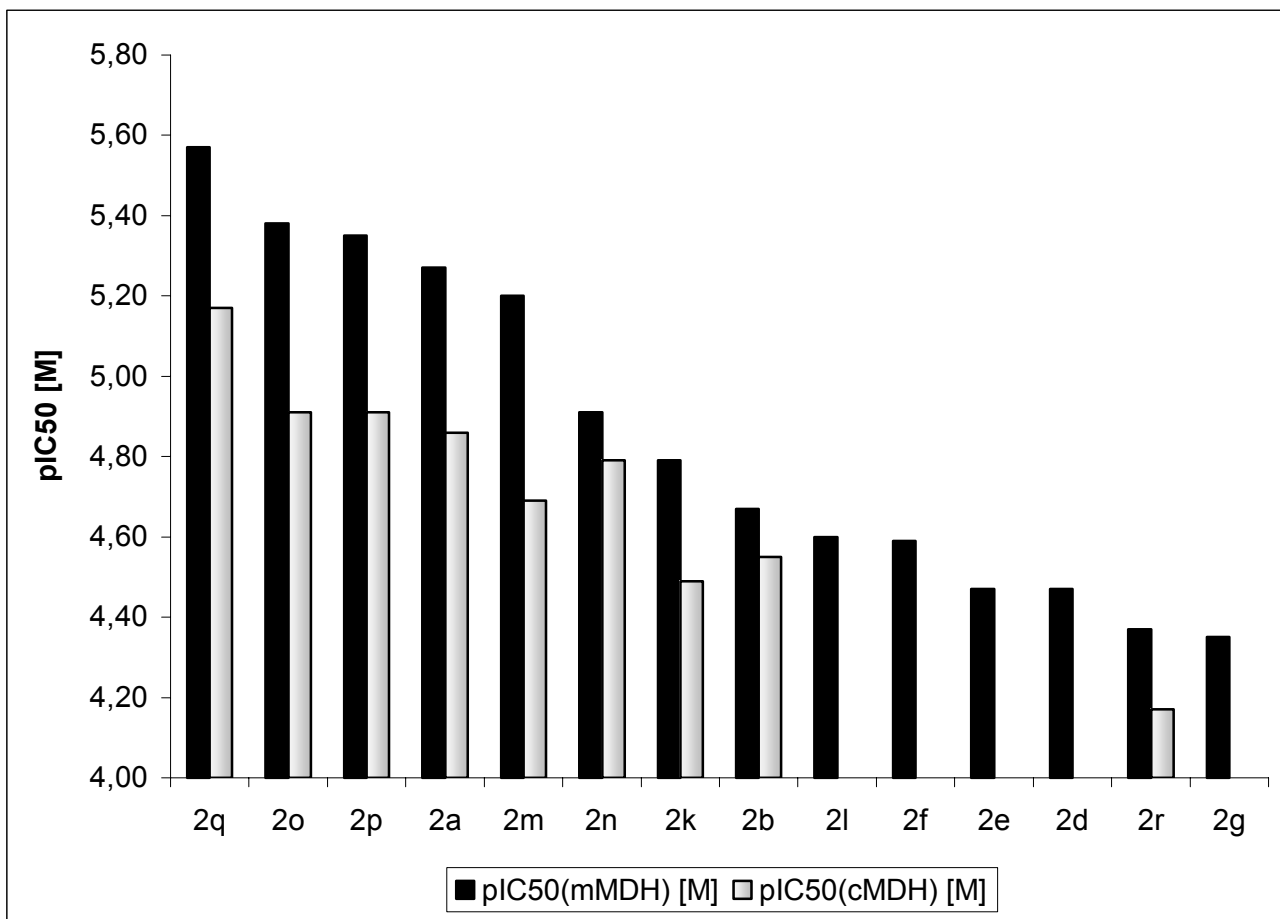


Diese Beobachtungen könnten die Vermutung zulassen, dass ein unspezifischer Hemmmechanismus vorliegt. Einige Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe um McGovern beziehen sich auf die Entdeckung „promiskuitiver Enzyminhibitoren“. Als promiskuitives Verhalten wird die Eigenschaft von Inhibitoren beschrieben, unselektiv eine Vielzahl verschiedener Enzyme zu hemmen, darunter auch Malatdehydrogenase. Erklärt wird das Phänomen durch die Bildung von Aggregaten der zu untersuchenden Substanzen, die dann die untersuchten Enzyme adsorbieren und deren Aktivität unspezifisch hemmen. Diese Inhibition zeichnet sich

durch einen nicht-kompetitiven Mechanismus aus.⁸¹⁻⁸⁴ Die Aggregatbildung kann durch den Zusatz geeigneter Detergentien unterdrückt werden.⁸⁵

Zur Überprüfung der selektiven mMDH-Hemmung sollte zum Vergleich die cMDH-Inhibition durch Paullone untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Kinetik der mMDH-Hemmung charakterisiert und die von Knockaert und Mitarbeitern²² beschriebenen Ergebnisse überprüft werden. Die Untersuchungen mit cMDH bestätigten die zuvor veröffentlichte Selektivität für mMDH. Die IC_{50} -Werte für cMDH waren für die Gruppe der 9-substituierten Paullone jeweils etwa dreifach höher als für mMDH. In Abbildung 4-5 sind die pIC_{50} -Werte der untersuchten Paullone gegenübergestellt.

Abbildung 4-5: Gegenüberstellung der pIC_{50} -Werte [M] der cMDH- und mMDH-Messungen.



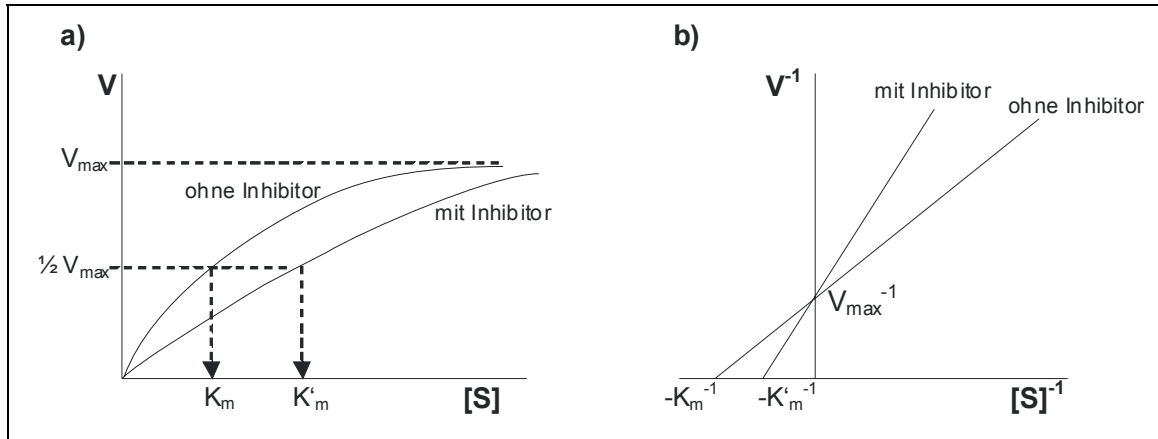
Fehlende Balken sind gleichbedeutend mit einem pIC_{50} -Wert < 4.00 .

4.1.4 Überprüfung der Kinetik

Wie zuvor beschrieben, deuten erste, bereits publizierte Untersuchungen auf einen NAD-kompetitiven Mechanismus für die Hemmung der mMDH durch Paullone hin.²² Zur Überprüfung dieses Befundes sollte die Kinetik der mMDH-Inhibition durch 6-Oxo-

5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-9-carbonsäurehexylester (**2p**) bestimmt werden. Der Ester **2p** wurde gewählt, da er einen der potentesten mMDH-Inhibitoren der Paullon-Reihe darstellte. Aufgrund der hohen Substrat-Spezifität der Malatdehydrogenasen für L-Malat (s. Kapitel 1.1) kann im Fall eines kompetitiven Hemmmechanismus' von einer Konkurrenz zwischen NAD^+ und dem untersuchten Paullon um die Bindungsstelle ausgegangen werden. Im Fall einer kompetitiven Hemmung können sich Inhibitor und Substrat oder in diesem Fall Inhibitor und Cosubstrat mit steigender Konzentration gegenseitig von der Bindungsstelle verdrängen. Diese Konkurrenz unterliegt dem Massenwirkungsgesetz und kann durch Veränderung einzelner Konzentrationen beeinflusst werden. Mit steigender Substrat-/Cosubstratkonzentration kann die Bildung eines Enzym-Inhibitor-Komplexes unterdrückt werden. Die Enzymreaktion würde weiter stattfinden, und die Maximalgeschwindigkeit der Substratumsetzung V_{\max} könnte erreicht werden. Die Maximalgeschwindigkeit der Substratumsetzung V_{\max} ist erreicht, wenn alle Enzymmoleküle mit Substrat bzw. Cosubstrat besetzt sind. Die halbmaximale Geschwindigkeit oder auch Halbsättigung $\frac{1}{2}V_{\max}$ ist erreicht, wenn die Hälfte der Enzymmoleküle besetzt ist. Diese Konzentration entspricht der Michaelis-Konstanten K_m . Bei der kompetitiven Hemmung wird mit steigender Inhibitorkonzentration K_m erhöht, während V_{\max} unverändert bleibt. In Gegenwart eines kompetitiven Inhibitors stellen sich die kinetischen Diagramme wie in Abbildung 4-6 dar.^{74, 86, 87}

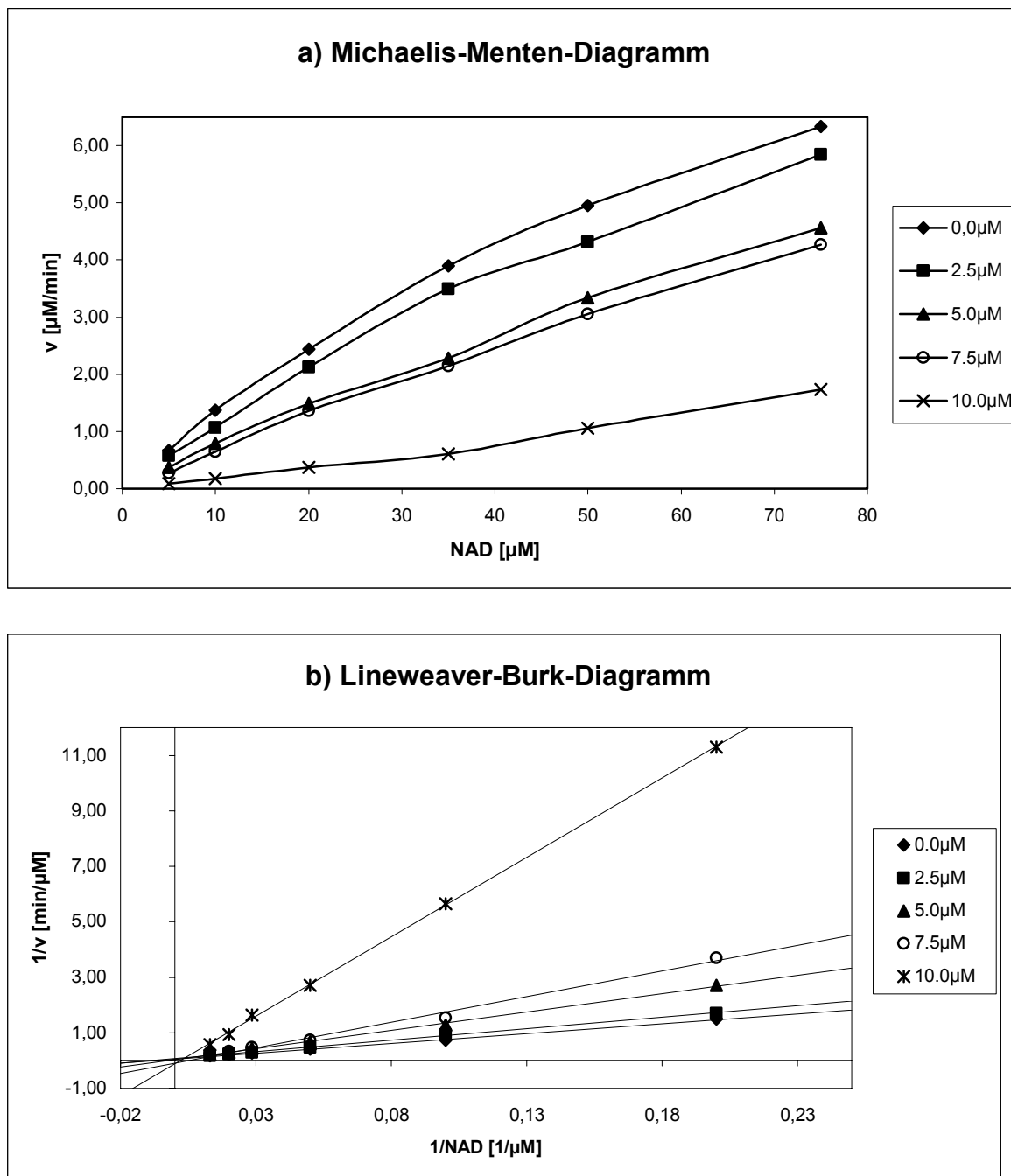
Abbildung 4-6: Die kinetischen Diagramme nach Michaelis-Menten (a) und Lineweaver-Burk (b) bei An- und Abwesenheit eines kompetitiven Inhibitors.



Basierend auf diesen Überlegungen sollte im Rahmen der Untersuchungen mit variierenden NAD^+ -Konzentrationen gearbeitet werden. In Anlehnung an die in der Literatur beschriebenen Kinetikuntersuchungen^{88, 89} wurde der Konzentrationsbereich für NAD^+ auf 0.0 – 75.0 μM festgelegt (s. Kap. 8.3). Die aus den Messungen hervorgegangenen kinetischen Diagramme sind in Abbildung 4-7 dargestellt. Aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm (b) ist eine kompetitive Hemmung der mMDH durch das Paullon **2p** abzulesen. Die Auswertung der Daten mit dem Programm GraphPad Prism[®] Version 4.00^{90, 91} ergab für die Michaelis-Konstante K_m einen Wert von 101.5 μM . Für die Maximalgeschwindigkeit V_{max} wurde ein Wert von 12.0 $\mu M/min$ ermittelt. Die Dissoziationskonstante K_i der betrachteten Inhibition beträgt 4.8 μM . Da ein kompetitiver Mechanismus für die mMDH-Hemmung nachgewiesen werden konnte, kann von einer spezifischen Enzyminhibition der mMDH durch Paullone

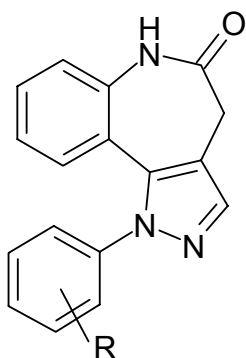
ausgegangen und eine promiskuitive Inhibition zumindest für potente Vertreter wie **2p** ausgeschlossen werden.

Abbildung 4-7: Die kinetischen Diagramme nach Michaelis-Menten (a) und Lineweaver-Burk (b) bei Anwesenheit des Paullons **2p**.

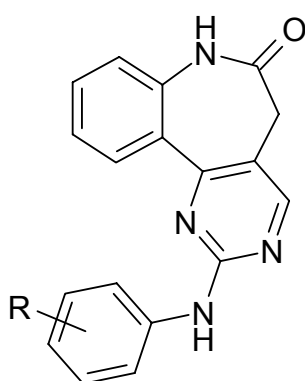


4.1.5 Testung der Paullon-Strukturanaloga

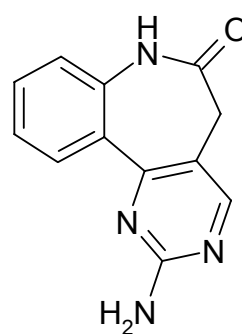
Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Strukturanaloga zu Paullonen (**2**), die 1-Aryl-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-one (**8**) und die 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-one (**9**), sollten ebenfalls auf ihre mMDH-inhibitorische Aktivität untersucht werden. Zunächst wurde eine Übersichtsmessung, bei der die Restaktivität der mMDH bei Anwesenheit von 10 μM der zu untersuchenden Verbindung bestimmt wurde, durchgeführt. Die Ergebnisse der Übersichtstestungen sind in Tabelle 4-10 zusammengefasst. Da beide Substanzklassen keine Aktivität gegenüber mMDH bei einer Konzentration von 10 μM zeigten, wurden keine weiteren Testungen angestrebt.



8a-p



9a-i



9j

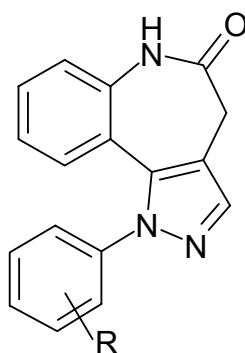
Tabelle 4-10: Restaktivität der mMDH $\pm s_M$ [%] bei Anwesenheit der Paullon-Strukturanaloga **8** und **9** [10 μ M].

	R	Restaktivität mMDH $\pm s_M$ [%]^{a, b}
8a	4'-H	102.0 \pm 0.3
8b	4'-Br	105.7 \pm 4.9
8c	4'-Cl	101.4 \pm 1.4
8d	2'-CH ₃	102.5 \pm 0.1
8e	4'-OCH ₃	102.7 \pm 2.4
8f	4'-CH ₃	99.6 \pm 4.8
8g	4'-CF ₃	98.7 \pm 1.8
8h	3', 5'-di-Cl	101.1 \pm 0.4
8i	4'- <i>tert.</i> Butyl	97.1 \pm 1.4
8j	2'-Cl	101.3 \pm 3.7
8k	3'-Cl	101.3 \pm 0.4
8l	2'-F	99.2 \pm 0.6
8m	2'-Br	94.5 \pm 3.9
8n	2', 4'-di-F	97.4 \pm 1.0
8o	4'-NO ₂	98.9 \pm 0.1
8p	4'-COOH	105.4 \pm 2.2
9a	4'-H	101.9 \pm 3.3
9b	4'-OCH ₃	100.0 \pm 1.2
9c	4'-Cl	90.6 \pm 1.1
9d	4'-I	100.9 \pm 0.3
9e	4'-NO ₂	55.9 \pm 1.0
9f	4'-CH ₃	96.5 \pm 2.8
9g	2'-Cl	96.2 \pm 0.0
9h	2'-Br	87.9 \pm 3.9
9i	4'-OH	100.7 \pm 1.1
9j	-	98.9 \pm 1.0

4.2 Antiproliferative Aktivität der 1-Aryl-4,6-dihydro-pyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-one

4.2.1 Testung der in vitro Antitumoraktivität

Die Testung der in vitro Antitumoraktivität der 1-Aryl-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-one (**8**) erfolgte am NCI (National Cancer Institute, Bethesda, USA).⁹²⁻⁹⁷



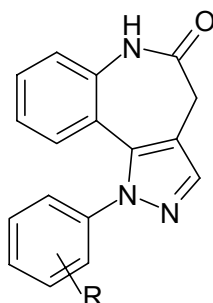
8a-p

Zunächst wurde ein High-Throughput Prescreening an drei Tumorzelllinien [MCF7 (Brustkrebs), NCI-H460 (Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, NSCLC), SF-268 (ZNS)] durchgeführt. Die Zelllinien wurden jeweils mit einer Konzentration von 0.1 mM der Prüfsubstanz versetzt. Anschließend wurde das prozentuale Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen überprüft. Das Wachstum der Kontrollzellen entspricht einem Wachstum von 100%. Somit bedeuten Werte oberhalb von 100% eine Wachstumsinduktion, ein Wert zwischen 0% und 100% eine Wachstumshemmung und negative Werte das Abtöten von

Zellen. Die Ergebnisse des NCI-Prescreenings mit den Pyrozolen **8** sind in Tabelle 4-11 zusammengestellt. Wird das Wachstum einer Zelllinie durch eine Substanz auf 32% oder weniger gesenkt, wird diese Substanz in das in vitro Antitumorscreening des NCI aufgenommen und an 50-60 Tumorzelllinien getestet. Dabei werden für jede Zelllinie GI_{50} -Werte (GI_{50} , engl.: 50% growth inhibition concentration) aus fünf verschiedenen Konzentrationsniveaus (10^{-8} bis 10^{-4} M) ermittelt. Die mittlere Antitumoraktivität, ausgedrückt als Meangraph Midpoint (MG_MID), berechnet sich als Mittelwert der einzelnen GI_{50} -Werte. Alle GI_{50} -Werte, auch der MG_MID, werden als dekadische Logarithmen ($\log_{10} GI_{50}$) angegeben. Liegt der GI_{50} -Wert einer Substanz unterhalb der niedrigsten getesteten Konzentration von 10^{-8} M, wird für den $\log_{10} GI_{50}$ -Wert < -8.00 angegeben. Ebenso wird für den $\log_{10} GI_{50}$ -Wert > -4.00 angegeben, wenn der GI_{50} -Wert einer Substanz oberhalb der höchsten getesteten Konzentration von 10^{-4} M liegt. Aus den einzelnen GI_{50} -Werten ergibt sich ein Selektivitätsprofil für jede Substanz. Ähnliche Selektivitätsprofile bei verschiedenen Testsubstanzen deuten darauf hin, dass der antiproliferativen Aktivität dieser Verbindungen ein verwandter oder identischer Wirkmechanismus zugrunde liegt. Der Ähnlichkeitsvergleich von Selektivitätsprofilen, die in der NCI-Datenbank abgelegt sind, kann computergestützt mit Hilfe des Programms „COMPARE“ über das Internet erfolgen. Die Ergebnisse der COMPARE-Analyse werden durch den Pearson Korrelationskoeffizienten (PCC, engl.: Pearson correlation coefficient) ausgedrückt. Die Werte des PCC liegen zwischen -1 und +1, wobei ein hoher Wert auf einen gleichen antiproliferativen Wirkmechanismus hindeutet. Aus der Gruppe der

1-Aryl-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-one wurden sechs Verbindungen (**8b**, **8e-8i**) in das in vitro Antitumorscreening aufgenommen. In Tabelle 4-12 sind die mittlere Antitumoraktivität der sechs getesteten Verbindungen, ausgedrückt durch den Meangraph Midpoint (MG_MID), sowie deren Wirkung auf die Brustkrebszellreihen HS 578T und MDA-MB-435 aufgeführt. Die beiden Brustkrebszelllinien wurden ausgewählt, da sie durch **8** überdurchschnittlich stark im Wachstum gehemmt wurden. Zum Vergleich sind die Werte für Kenpaullon (**2a**) und Alsterpaullon (**2b**) angegeben.

Tabelle 4-11: Ergebnisse des High-Throughput Prescreenings an drei Tumorzelllinien (Zellwachstum [%]).



8 a-p

	R	MCF7 (Brustkrebs)	NCI-H460 (NSCLC)	SF-268 (ZNS)
8a	4'-H	55	33	90
8b*	4'-Br	51	32	98
8c	4'-Cl	54	41	80
8d	2'-CH ₃	64	49	98
8e*	4'-OCH ₃	60	26	88
8f*	4'-CH ₃	57	29	95
8g*	4'-CF ₃	52	28	k.A.
8h*	3', 5'-di-Cl	40	21	62
8i*	4'- <i>tert.</i> Butyl	130	11	k.A.
8j	2'-Cl	66	53	71
8k	3'-Cl	64	39	101
8l	2'-F	66	49	98
8m	2'-Br	69	44	87
8n	2', 4'-di-F	61	41	98
8o	4'-NO ₂	55	62	62
8p	4'-COOH	k. A.	k. A.	k. A.

* Substanz wurde in das in vitro Antitumorscreening des NCI aufgenommen.
k. A.: keine Angabe.

Tabelle 4-12: In vitro Antitumoraktivität $\log_{10} \text{GI}_{50}$ [M] der getesteten Pyrazolobenzazepinone (**8b**, **8e-8i**).

	R	$\log_{10} \text{MG_MID}^{\text{a, b}}$	$\log_{10} \text{GI}_{50}$ HS 578T^b	$\log_{10} \text{GI}_{50}$ MDA-MB-435^b
2a	9-Br	-4.35	-4.00 ^d	-4.00 ^d
2b	9-NO ₂	-6.25	-5.06	-6.30
8b	4'-Br	-4.83	-5.65	-5.72
8e	4'-OCH ₃	-5.74/-6.43	-6.88/-6.31	-7.61/-6.80
8f	4'-CH ₃	-4.91	-5.42	-5.68
8g	4'-CF ₃	-5.08	-6.92	-4.95
8h	3', 5'-di-Cl	-6.28/-6.29	-7.93/-5.60	-8.00/-8.00 ^c
8i	4'- <i>tert.</i> Butyl	-4.65	-4.59	-4.73
8p	4'-COOH	-4.00 ^d	-4.00 ^d	-4.00 ^d
Cis-Pt^e	-	-5.68	-5.60	-5.60
MTX^e	-	-6.94	-5.12	-7.13
L-PAM^e	-	-4.58	-4.29	-4.38

^a Der Meangraph Midpoint (MG_MID) ist der Mittelwert der GI_{50} -Werte für die Tumorzelllinien des NCI-Antitumor Drug Screenings. GI_{50} = Substanzkonzentration, die das Tumorwachstum auf die Hälfte reduziert.

^b Ergebnisse aus zwei unabhängigen Testreihen sind durch Schrägstriche voneinander getrennt.

^c Der GI_{50} -Wert dieser Substanz liegt unterhalb der niedrigsten getesteten Konzentration von 10^{-8} M.

^d Der GI_{50} -Wert dieser Substanz liegt oberhalb der höchsten getesteten Konzentration von 10^{-4} M.

^e Cis-Pt = Cis-Platin; MTX = Methotrexat ; L-PAM = Melphalan

Bei der Zelllinien-Testung des NCI lieferten die Verbindungen **8e** und **8h** besonders interessante Ergebnisse. Während die mittlere Antitumoraktivität dieser Verbindungen im Bereich von Alsterpaullon (**2b**) liegt, hemmen sie die Brustkrebszelllinien HS 578T und MDA-

MB-435 bei deutlich geringeren Konzentrationen. Damit übertrifft z.B. **8h** bei weitem die antiproliferative Aktivität etablierter Antitumorwirkstoffe wie Cis-Platin (Cis-Pt) und Melphalan (Alkeran[®]; L-PAM) und ist mit der Aktivität von Methotrexat (MTX) vergleichbar (Tabelle 4-12). Obwohl die mittlere Antitumoraktivität der getesteten Pyrazolobenzazepinone **8b**, **8f** und **8g** im Vergleich zu den Paullonen **2a** und **2b** nicht besonders hoch war, zeigten sie dennoch eine höhere Aktivität gegenüber der Brustkrebszelllinie HS 578T. Mit Hilfe einer Matrix-COMPARE-Analyse (Tabelle 4-13) wurde untersucht, ob für die getesteten Pyrazolobenzazepinone **8** ein gemeinsamer Wirkmechanismus angenommen werden kann (s. oben). Die Paullone **2a** und **2b** wurden aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu **8** in die Analyse eingebunden, obwohl schon die in Tabelle 4-12 aufgeführten GI₅₀-Werte darauf hindeuteten, dass kein gemeinsamer Wirkmechanismus der Paullone **2** und der Pyrazolobenzazepinone **8** vorliegt.

Tabelle 4-13: Ergebnisse der COMPARE-Analyse mit den Pyrazolobenzazepinonen **8b**, **8e-8i** und den Paullonen **2a** und **2b**.^{a, b}

PCC	2a	2b	8b	8e	8f	8g	8h
8i	0.274 (49)	0.069 (52)	0.284 (52)	0.246 (52)	0.446 (52)	0.085 (49)	0.273 (52)
8h	0.360 (55)	0.202 (58)	0.558 (55)	0.723 (57)	0.549 (55)	0.168 (52)	
8g	-0.087 (49)	-0.420 (52)	0.391 (52)	0.219 (52)	0.339 (52)		
8f	0.240 (52)	0.010 (55)	0.853 (55)	0.432 (55)			
8e	0.109 (54)	-0.052 (57)	0.508 (55)				
8b	0.127 (52)	-0.131 (55)					
2b	0.500 (57)						

^a Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der Anzahl der Zelllinien, für die GI₅₀-Werte bei den jeweils verglichenen zwei Verbindungen vorlagen und die daher für die Ermittlung der Pearson Korrelationskoeffizienten (PCC) herangezogen wurden.

^b PCC oberhalb von 0.350 sind fett gedruckt. Nach den bisherigen Erfahrungen mit COMPARE-Analysen deuten Werte > 0.350, die auf einem Vergleich von > 50 Zelllinien beruhen, auf einen ähnlichen Wirkmechanismus hin.⁹⁸

Innerhalb der Gruppe der Pyrazolobenzazepinone **8** sind hohe Korrelationen zu finden. Von fünfzehn ermittelten PCC liegen acht über 0.350 und fünf über 0.500, was einen gemeinsamen Wirkmechanismus nahelegt. Während **2a** und **2b** erwartungsgemäß eine signifikante Korrelation ergeben (PCC = 0.500), wird beim paarweisen Vergleich zwischen Vertretern aus den Verbindungsklassen **2** und **8** nur in einem Fall (**2a** - **8h**) von möglichen zwölf Vergleichen ein Wert über 0.350 beobachtet. Dies

lässt vermuten, dass die Pyrazolobenzazepinone **8** einen anderen antiproliferativen Effekt ausüben als die genannten Paullone.

4.2.2 Testung der Proteinkinase-inhibitorischen Aktivität

Die antiproliferative Aktivität von anellierten Benzazepinonen wie den Pyrazolobenzazepinonen **8**, könnte auf einer Hemmung von Proteinkinasen beruhen, die in vielfältiger Weise an der Regulation der Zellteilung beteiligt sind. Die Vermutung eines derartigen Mechanismus' kann aus der strukturellen Ähnlichkeit zu den Paullonen (**2**) abgeleitet werden, die bekanntlich Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) und Glykogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) hemmen. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden die Pyrazolobenzazepinone **8a-p** einem breiten Screening bei der Firma ProQinase (ProQinase GmbH, Freiburg) auf Inhibition von 24 Proteinkinasen unterzogen, die mit Krebserkrankungen in Zusammenhang gebracht werden. Die entsprechenden Kinasen (EGF-R, EphB4, ERBB2, FAK, IGF1-R, SRC, VEGFR-2, VEGFR-3, AKT1, Aurora A, Aurora B, CDK2/cyc A, CDK4/cyc D1, CK2- α 1, PLK1, TIE2, FLT3, INS-R, MET, PDGFR- β , ARK5, PAK4, PDK1 und SAK) wurden jeweils mit 10 μ M der Testsubstanzen inkubiert und anschließend die Restaktivität [%] jeder Kinase bestimmt. „INS-R“ steht für den Insulin-Rezeptor, der als essentielles Enzym für den Stoffwechsel nicht inhibiert werden sollte. Zur Bestimmung der Restaktivität wurden die Messergebnisse mit der jeweiligen Testsubstanz zu der enzymatischen Aktivität der einzelnen Kinasen ins Verhältnis gesetzt. Die enzymatische Aktivität berechnet sich

aus dem Wert einer Kontrollprobe ohne Proteinkinase („low control“) und dem Wert einer Kontrollprobe mit der jeweiligen Kinase, aber ohne Inhibitor („high control“). Die Restaktivität ergibt sich somit aus der Berechnung nach folgender Formel:

$$\text{Restaktivität [\%]} = \frac{\text{Messergebnis mit Testsubstanz} - \text{low control}}{\text{high control} - \text{low control}} \cdot 100\%$$

Die aus der Erstellung der Inhibitionsprofile erhaltenen Ergebnisse können der Tabelle 8-11 (Kap. 8.3.3) entnommen werden. Von den 16 untersuchten Pyrazolobenzazepinonen bewirkten lediglich drei Verbindungen (**8c**, **8k** und **8i**) an mindestens einer der getesteten Kinasen eine Hemmung von $\geq 40\%$ (Restaktivität $\leq 60\%$). Von diesen Verbindungen wurden in einer weiteren Testreihe IC_{50} -Werte ermittelt. Für alle drei Verbindungen konnte eine Hemmung von VEGFR-2 und VEGFR-3 im mikromolaren Bereich nachgewiesen werden. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass in Kapitel 4.3 eine Vorstellung der für diese Arbeit relevanten Kinasen folgt. Für Verbindung **8c** wurden folgende IC_{50} -Werte ermittelt: VEGFR-2: 62 μM und VEGFR-3: 63 μM . Verbindung **8k** hemmt neben VEGFR-2 (40 μM) und VEGFR-3 (28 μM) auch noch FAK (61 μM). Auch **8i** hemmt VEGFR-2 (24 μM) und VEGFR-3 (16 μM), zeigt aber ebenfalls mikromolare Hemmungen der Kinasen EphB4 (56 μM) und SRC (55 μM). Für die 16 hier vorgestellten Pyrazolobenzazepinone **8** kann aufgrund dieser Befunde festgestellt werden, dass deren

antiproliferative Wirkung nicht auf der Hemmung einer der getesteten 24 Kinasen beruht.

4.3 Kinaseinhibition durch 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-one

Die Testung der Proteinkinase-inhibitorischen Aktivität der 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-one (**9a-q**) erfolgte ebenfalls durch die Firma ProQinase (ProQinase GmbH, Freiburg). Wiederum wurde zunächst ein Inhibitionsprofil an jeweils 24 verschiedenen Kinasen (EGF-R, EphB4, ERBB2, FAK, IGF1-R, SRC, VEGFR-2, VEGFR-3, AKT1, Aurora A, Aurora B, CDK2/cyc A, CDK4/cyc D1, CK2- α 1, PLK1, TIE2, FLT3, INS-R, MET, PDGFR- β , ARK5, PAK4 oder COT, PDK1 oder BRAF-VE und SAK) für jede der zu testenden Substanzen erstellt (Tabelle 8-11, Kap. 8.3.3). Anschließend erfolgte eine IC₅₀-Wert-Bestimmung für die getesteten Verbindungen (Tabellen 8-12 und 8-13, Kap. 8.3.3), die an mindestens einer der überprüften Kinasen eine Hemmung von $\geq 40\%$ (Restaktivität $\leq 60\%$) bewirkten (s. Kap. 4.2.2). Um die Beurteilung der Kinase-inhibitorischen Aktivität durch **9a-q** zu verdeutlichen, soll an dieser Stelle auf die Rolle einzelner Kinasen in der Tumorgenese eingegangen werden.

4.3.1 Funktion einzelner Proteinkinasen in der Tumorgenese

Bei der Regulation grundlegender zellulärer Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Proliferation, Bewegung (Migration) und Zelltod (Apoptose) spielt die Phosphorylierung von Proteinen eine zentrale Rolle. Proteinkinasen vermitteln hierbei die Übertragung von Phosphatresten von Adenosintriphosphat (ATP) auf die zu regulierenden Proteine. Genetische Veränderungen dieser Enzyme sowie Stimulation durch Wachstumsfaktoren können zu einer überhöhten Aktivität und dadurch zu unkontrolliertem Zellwachstum führen, was das Hauptmerkmal einer Tumorerkrankung darstellt. Die Phosphorylierung von Proteinen führt in der Tumorgenese zu Signal-Transduktionsprozessen, die die Zellproliferation, die Transkription, das Überleben (Survival), die Angiogenese, die Metastasierung und die Apoptose steuern.^{26, 99, 100}

Mit der Aufklärung des Protein-Kinase-Komplements des menschlichen Genoms („Kinom“) konnten 518 Proteinkinasen identifiziert und in verschiedene Klassen und Familien eingeteilt werden. In Abhängigkeit ihrer Substratspezifität lassen sie sich in Serin-/Threonin- und in Tyrosinkinasen gliedern. Die Tyrosinkinasen lassen sich zusätzlich in membranständige Rezeptor-Tyrosinkinasen und cytosolische nicht-Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinasen unterteilen.^{99, 101}

4.3.1.1 Serin-/Threoninkinasen

Die physiologischen Funktionen der Serin-/Threoninkinasen, die mit Tumorerkrankungen in Zusammenhang gebracht werden, sind häufig durch Mutationen verändert. Dies führt entweder zu überschießender Aktivität oder zu einem Funktionsverlust der einzelnen Kinase. Einige dieser Enzyme wurden als Tumorsuppressorgene identifiziert, deren Wirkverlust mit einer Erhöhung des Krebsrisikos einhergeht.²⁶

Zu den in dieser Arbeit betrachteten Serin-/Threoninkinasen gehören die Kinasen Aurora A, Aurora B, AKT1, ARK5, BRAF-VE, CDK2/cyc A, CDK4/cyc D1, CK2- α 1, COT, PAK4, PDK1, PLK1 und SAK. Die 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-one (**9a-q**) zeigten in der Gruppe der Serin-/Threoninkinasen besonders gegenüber Aurora A und Aurora B eine Hemmaktivität.

Aurora A und B:

Die Kinasen Aurora A und B gehören zu der Familie der Aurora-Kinasen, welche die Vorgänge der Mitose (Zellteilung) regulieren. Damit liegt ihre Bedeutung für die Tumorgenese vor allem in den Abläufen der Proliferation. Aurora A ist am Aufbau der Zentrosomen und des Spindelapparates beteiligt.¹⁰² Desweiteren besitzt sie eine Schlüsselrolle in der p53-Signalkaskade. Eine Überexpression führt zu verschiedenen Spindeldefekten (z. B. zu mono- oder multipolaren Spindeln) und damit zu irregulärer Zellteilung. Durch Erniedrigung der p53-Expression werden darüber hinaus weitere wichtige

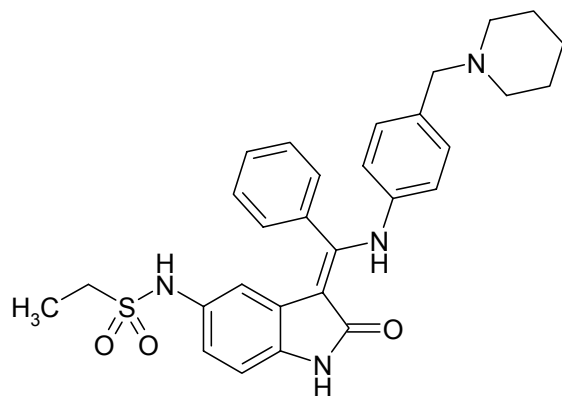
zelluläre Regulationsmechanismen ausgeschaltet, was eine onkogene Transformation erleichtert.¹⁰³⁻¹⁰⁵

Aurora B ist ein sog. chromosomales Passenger-Protein, dessen Funktion vornehmlich in der Regulation der Zytokinese und in der Steuerung der Chromosomenanordnung in der Metaphase liegt.^{102,}

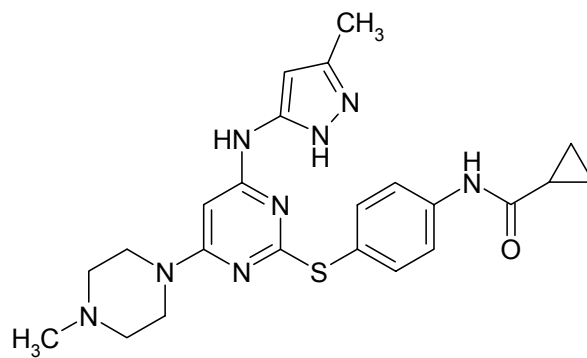
¹⁰⁵ Eine Überexpression des Aurora B-Kinase-Mutanten (K-R) führt zu multiplen Defekten im Mitoseablauf.¹⁰⁵

Eine Überexpression der Aurora-Kinasen wurde mittlerweile bei einer Vielzahl von Krebsarten beobachtet, u. a. bei Brust-, Pankreas- und Ovarialtumoren sowie bei Tumoren des Gastrointestinaltrakts, insbesondere des Dickdarms. Erste Aurora-Inhibitoren sind Hesperadin (**52**) (Boehringer Ingelheim), VX-680 (**53**) (Vertex Pharmaceuticals) und ZM447439 (**54**) (AstraZeneca), die Aurora-Kinasen im nanomolaren Bereich hemmen (Abbildung 4-8).^{106, 107}

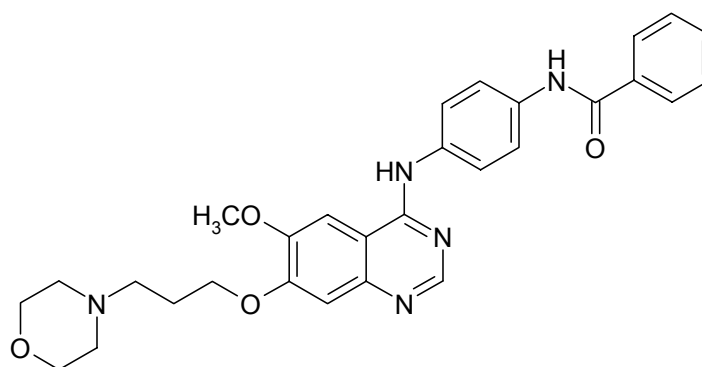
Abbildung 4-8: Literaturbekannte Aurora A- und B-Kinase-Inhibitoren.



52



53



54

4.3.1.2 Tyrosinkinasen

Die Tyrosinkinasen werden entsprechend ihrer Lokalisation in membranständige Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) und nicht-Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinasen (non-receptor PTK) unterteilt.

Die Rezeptor-Tyrosinkinasen sind membranständige Rezeptoren, die eine ligandenbindende Domäne an der extrazellulären Oberfläche, eine transmembranäre Domäne sowie eine intrazelluläre Kinase-Domäne besitzen. Über die Kinase-Domäne wird ihre Kinaseaktivität vermittelt. Die Aktivierung der RTK erfolgt über eine Liganden-induzierte Dimerisierung, die eine Tyrosin-Autophosphorylierung der Kinase-Domäne bewirkt. Intrazelluläre Signalproteine erkennen die phosphorylierten Tyrosinreste als Anheftungsstellen und lösen schließlich die Signalkaskade aus. Eine Überexpression oder Mutationen führen zu konstitutiver Dimerisierung und dadurch zu einer Erhöhung der Kinaseaktivität. Zu den in dieser Arbeit betrachteten Rezeptor-Tyrosinkinasen gehören die Kinasen INS-R, TIE2, FLT3, MET, PDGFR- β , EGF-R, EphB4, ERBB2, IGF1-R, VEGFR-2 und VEGFR-3.^{26, 99, 108} Die getesteten Pyrimidobenzazepinone **9a-q** zeigten insbesondere eine Inhibition von VEGFR-2, VEGFR-3 und TIE2.

VEGFR und TIE2 (TEK)

VEGF- (vascular endothelial growth factor) und TIE- (tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF factor homology domains/protein receptor tyrosine kinase, epithelial specific) Rezeptorfamilien spielen

eine wichtige Rolle in der Tumorangiogenese, in der neue Blutgefäße gebildet werden. Ihre Aktivierung erfolgt durch ihre natürlichen Liganden VEGF respektive Angiopoietin und führt zum Wachstum des Endothels und zur Ausbildung neuer Gefäße, die die Versorgung des Primärtumors sicherstellen. Die Gefäßneubildung ist normalerweise bei Prozessen wie der Wundheilung, Entzündungsabläufen, dem Menstruationszyklus und der Embryogenese essentiell. In pathologischen Situationen verläuft sie häufig unkontrolliert. Beispiele sind neben den Tumorerkrankungen rheumatoide Arthritis, Retinopathie und Psoriasis vulgaris (Schuppenflechte).¹⁰⁹⁻¹¹¹

Für VEGF werden drei Rezeptoren beschrieben: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) und VEGFR-3 (Flt-4). VEGFR-1 und -2 werden primär auf proliferierenden Endothelzellen exprimiert, während VEGFR-3 fast ausschließlich auf Lymphendothelzellen exprimiert wird und somit in der Tumorgenese v. a. für die lymphangiogene Metastasierung von Interesse ist. In den meisten soliden Tumoren liegt VEGF in erhöhter Konzentration vor. Die VEGF-Rezeptoren 1 und 2 werden durch Gefäße in der Nähe des Tumors überexprimiert.¹¹²

Angiopoietin 1 (Ang1) aktiviert den Endothelzell-spezifischen TIE2-Rezeptor, der dadurch eine gefäßstabilisierende Wirkung besitzt. Angiopoietin 2 (Ang2) wirkt kompetitiv zu Ang1 und inaktiviert die Kinaseaktivität von TIE2, was zu einer Gefäßdestabilisierung führt. Es wird angenommen, dass die daraus resultierende Regression der Gefäße Voraussetzung für die Neubildung funktionierender Gefäße ist und sich somit das Gefäßsystem den Bedingungen des Tumors und seines Wachstums anpasst. Darüber hinaus wird

vermutet, dass Angiopoietin und VEGF kooperieren. Ang2 induziert die Gefäßdestabilisierung, welche einen proangiogenen Effekt auslöst. Durch VEGF kommt es anschließend zu einer verstärkten Tumorangiogenese.¹¹²

Die Indolinone SU5416 (**55**), SU6668 (**56**) und SU11248 (**57**) besitzen VEGFR-inhibitorische Aktivität. SU5416 zeigte zwar als erster Vertreter dieser Gruppe eine selektive und potente VEGFR-2-Hemmung, konnte jedoch in klinischen Prüfungen nicht überzeugen. SU 6668 bewirkt neben einer VEGFR-2-Inhibition auch eine Hemmung von PDGFR- β und FGFR1, hat aber neben dem Effekt auf Tumorzellen auch einen starken Einfluss auf intakte Zellen. SU11248 hemmt die Kinasen VEGFR-2, PDGFR- α , PDGFR- β , Kit und FLT3 und zeigte in vivo eine gute Aktivität gegenüber dem Nierenzellkarzinom. Außerdem gibt es vielversprechende Ergebnisse bei Imatinib-resistenten gastrointestinalen Stromatumoren. SU11248 (Sunitinib, Sutent) ist in den USA als Tumorthapeutikum zugelassen.¹¹³⁻¹¹⁶

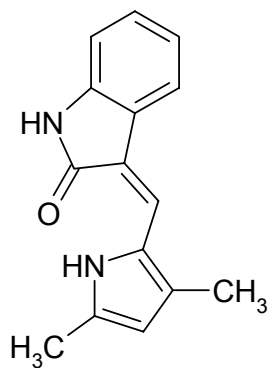
ZD6474 (**58**) ist ein Anilinchinazolin mit inhibitorischer Aktivität gegenüber VEGFR-2 und EGFR. Zur Zeit befindet sich ZD6474 in klinischen Prüfungen der Phase II und ist für die Phase III angemeldet. Die Untersuchungen beziehen sich unter anderem auf das NSCLC und das Nierenzellenkarzinom. In in vitro Testungen an Mäusen zeigte sich ein verstärkter antiproliferativer Effekt bei der Kombination von ZD6474 mit SC-236, einem selektiven COX2-Inhibitor.¹¹⁷⁻¹¹⁹

PTK 787/ZK 222584 (Vatalanib) (**59**) hemmt VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3. PDGFR- β , c-Kit und c-Fms werden ebenfalls inhibiert, jedoch in geringerem Maße als die VEGF-Rezeptoren. Die

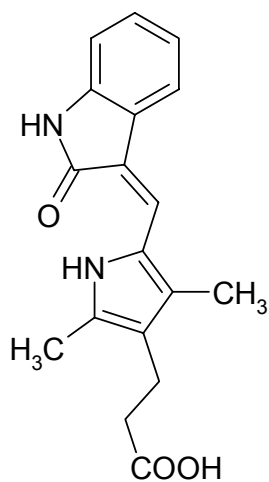
Substanz befindet sich derzeit u. a. in klinischen Phase III Studien bei Patienten mit kolorektalem Karzinom (CRC).^{120, 121}

Bevacizumab (Avastin[®], Hoffmann-La Roche) ist ein monoklonaler Antikörper, der sich gezielt gegen VEGF richtet. Bevacizumab bindet VEGF und verhindert ein Andocken an den Rezeptor, wodurch die Signalkaskade unterbunden wird. Dadurch bleibt eine weitere Gefäßneubildung aus und bereits gebildete Gefäße bilden sich zurück. Im Januar 2005 erhielt Bevacizumab in Kombination mit einer intravenösen Chemotherapie (z. B. 5-Fluorouracil/Folinsäure) die Zulassung für den europäischen Markt zur Erstlinienbehandlung von Patienten mit fortgeschrittenem Dickdarm- und Enddarmkrebs.^{122, 123} Abbildung 4-9 gibt die Strukturen der zuvor beschriebenen VEGFR-Hemmstoffe wieder.

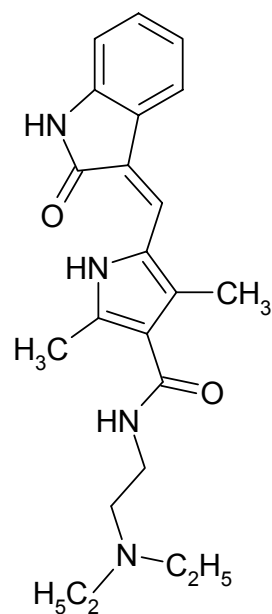
Abbildung 4-9: Literaturbekannte VEGFR-Hemmstoffe.



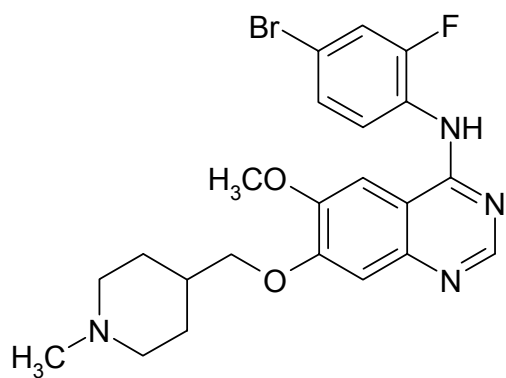
55



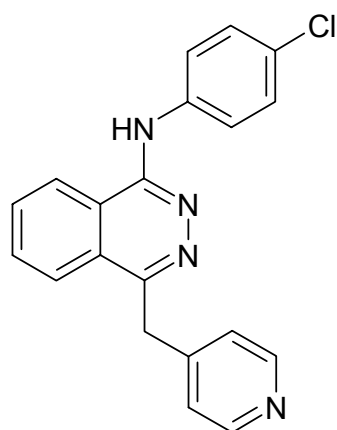
56



57



58



59

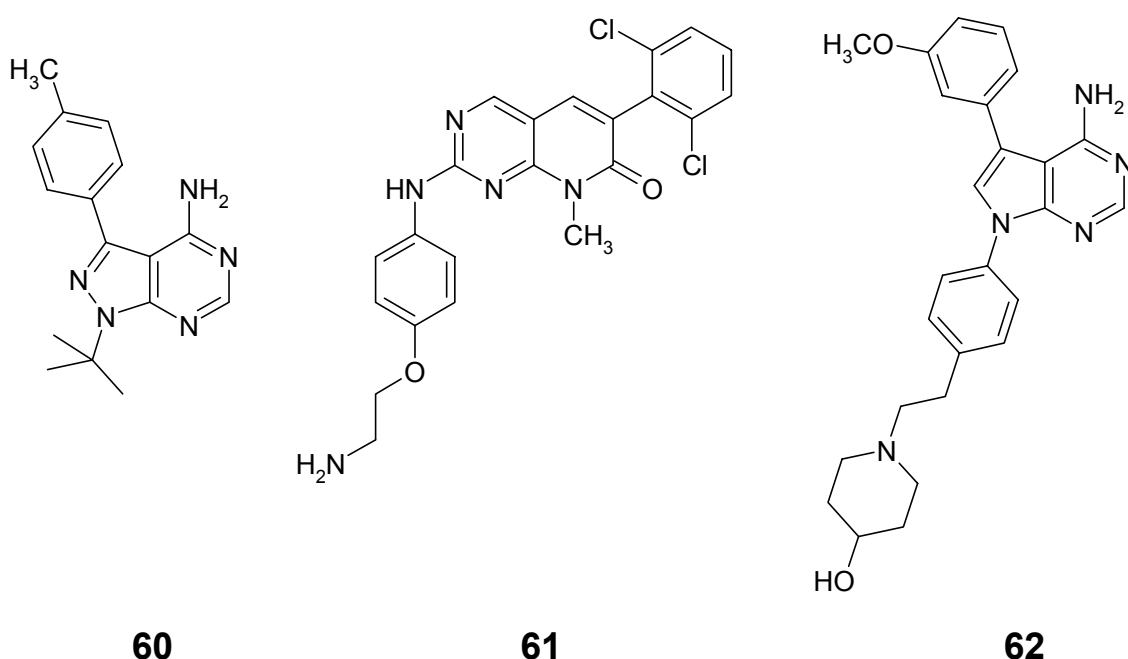
Die nicht-Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen (non-receptor PTK) sind Proteine, die meistens im Cytoplasma, seltener im Zellkern vorliegen. Sie assoziieren häufig mit Rezeptoren, die selbst keine intrinsische Aktivität besitzen (z. B. Cytokinrezeptoren, T-/B-Zellrezeptoren). Nur eine geringe Anzahl solcher Proteine wird mit Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht. Die in dieser Arbeit betrachteten Nicht-Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen sind die FAK (Focal Adhesion Kinase) und SRC- (Rous Sarcoma Virus Transforming Oncogene) Kinase, gegen die die untersuchten Pyrimidobenzazepinone **9a-q** ebenfalls eine inhibitorische Aktivität zeigten.^{26, 108}

SRC

Die SRC- (Rous Sarcoma Virus Transforming Oncogene) Tyrosinkinase ist der Prototyp der SRC-Familie, zu der noch neun weitere Kinasen gehören (Yes, Fyn, Fgr, Blk, Lck, Lyn, Hck, Frk und Yrk). Normalerweise ist die SRC an der Zellproliferation, der Zellbewegung und der interzellulären Kommunikation beteiligt. Eine Aktivierung und/oder Überexpression der SRC konnte in einigen Tumorgeweben festgestellt werden. Es wird vermutet, dass diese erhöhte Aktivität eine entscheidende Rolle für die Tumorgenese spielt und zu einer erhöhten Zellproliferation, Invasion und Beweglichkeit führt. SRC-Überexpressionen wurden u. a. in Tumorgeweben der Brust, des Pankreas, des Dickdarms, der Ovarien, des Magens, der Lunge und der Prostata nachgewiesen.¹²⁴⁻¹²⁷

Einige synthetisch gewonnene Verbindungen sind potente und selektive Hemmstoffe der Kinasen der SRC-Familie, dazu zählen u.a. PP1/AGL 1872 (**60**), PD116285 (**61**) und CGP77675 (**62**) (Abbildung 4-10). Alle drei Substanzen hemmen SRC in vitro im nanomolaren Bereich.¹²⁸⁻¹³¹

Abbildung 4-10: Literaturbekannte SRC-Inhibitoren.

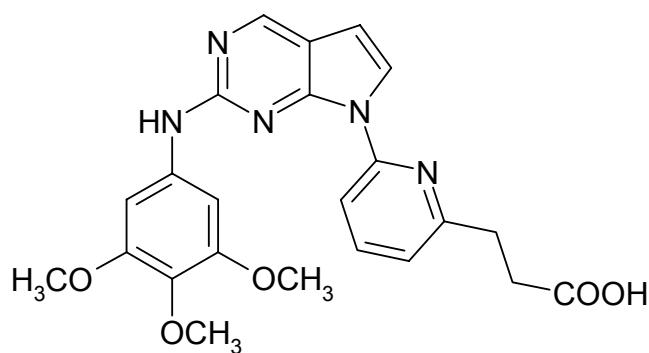


FAK

Die FAK reguliert die Zellbewegung und Invasion in andere Gewebe. Die Aktivierung der FAK erfolgt durch Anlagerung an Integrine. Integrine sind transmembranäre Proteine, die die Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix (ECM) vermitteln. Da sie keine eigene katalytische Aktivität besitzen, werden Signale, die durch ECM-Integrin-Interaktionen entstehen, an intrazelluläre

Protein-Tyrosinkinasen wie FAK, aber auch ABL oder SRC weitergegeben. FAK steigert die Zellmotilität und Invasion und spielt somit in der Tumorgenese eine bedeutende Rolle bei der Metastasierung von Karzinomen.¹³²⁻¹³⁴

Choi und Mitarbeiter beschreiben eine Gruppe von 7*H*-Pyrrolo-[3,2-*d*]pyrimidinen als Hemmstoffe der FAK. Aus dieser Gruppe ist **63** mit einem IC₅₀-Wert von 4 nM der potenteste Vertreter.¹³⁵

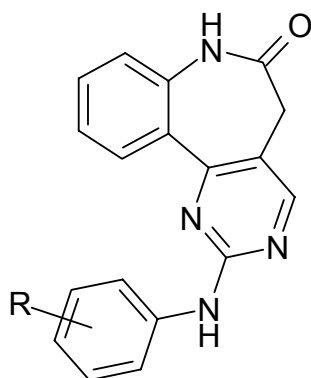


63

4.3.2 VEGFR-Inhibition durch 2-Anilino-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-one

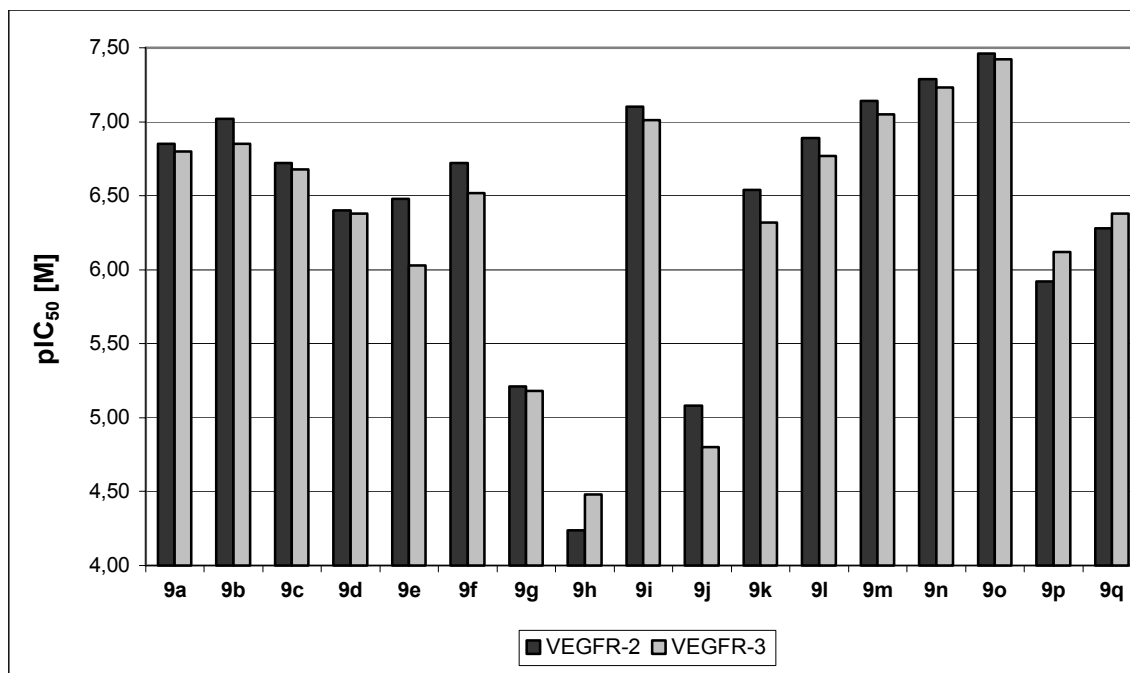
Die untersuchten Verbindungen **9a-q** zeigten eine gute Aktivität gegenüber den Rezeptor-Tyrosinkinasen VEGFR-2 und VEGFR-3, wobei bei den meisten Fällen eine leichte Selektivität für VEGFR-2 beobachtet wurde. Für einige 2'-substituierte Derivate (**9h**, **9p** und **9q**) konnte eine Umkehrung dieses Effekts festgestellt werden. Insbesondere die Hydroxyl- und Methoxyderivate (**9b**, **9i**, **9m**, **9n** und **9o**) erwiesen sich als potente VEGFR-Hemmstoffe mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich (Abbildung 4-11; s. auch Kap. 4.3.3).

Abbildung 4-11: VEGFR-2- und der VEGFR-3-Inhibition durch 2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-one (**9**).



9

a: R = H; **b:** R = 4'-OCH₃; **c:** R = 4'-Cl; **d:** R = 4'-I; **e:** R = 4'-NO₂; **f:** R = 4'-CH₃;
g: R = 2'-Cl; **h:** R = 2'-Br; **i:** R = 4'-OH; **j:** R = freies Amin (ohne Phenyl);
k: R = 4'-Br; **l:** R = 4'-OC₂H₅; **m:** R = 3'-OH, 4'-OCH₃; **n:** R = 3'-OH;
o: R = 3'-Cl, 4'-OH; **p:** R = 2'-CH₃, 4'-OH; **q:** R = 2'-OH

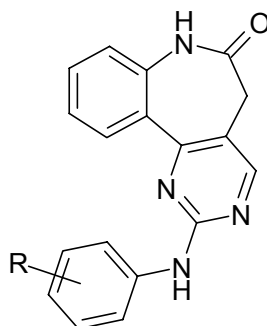


4.3.3 Struktur-Aktivitätsbeziehungen für die Kinase-Inhibition durch Pyrimidobenzazepinone **9**

Innerhalb der Serie von Kinasen, an denen die Verbindungen **9a-q** untersucht wurden, zeigte sich eine Selektivität der Inhibition für VEGFR-2, VEGFR-3, Aurora A und B, TIE2, FAK und SRC. Die folgende Diskussion der Struktur-Wirkungsbeziehungen dieser Substanzklasse wird deshalb auf die Ergebnisse mit den genannten Kinasen beschränkt (Tabelle 4-14).

Die Daten zeigen, dass sich eine 3'-Substitution (**9n**), insbesondere eine 3',4'-Disubstitution (**9o**, **9m**) vorteilhaft auf die Proteinkinase-inhibitorische Aktivität der Pyrimidobenzazepinone auswirkt, denn 3',4'-disubstituierte Vertreter sind sowohl der unsubstituierten Verbindung **9a** als auch 4'-monosubstituierten Derivaten überlegen. Eine 4'-Substitution mit den +M-Substituenten -OH (**9i**), -OCH₃ (**9b**) und -OC₂H₅ (**9l**) führt im Vergleich zu dem unsubstituierten Anilinopyrimidin **9a** zu einer Aktivitätssteigerung. Innerhalb dieser Gruppe hat die phenolische Verbindung **9i** die höchste Aktivität. Andere Substitutionen in 2'- oder 4'-Position führten im Vergleich zu **9a** zu einer Aktivitätsminderung. Auch der Verlust des Phenylrests (**9j**) bewirkt eine deutliche Abschwächung der Aktivität um etwa zwei Größenordnungen.

Tabelle 4-14: IC₅₀-Werte [μM] der Anilinopyrimidine **9** an ausgewählten Proteinkinasen.



9

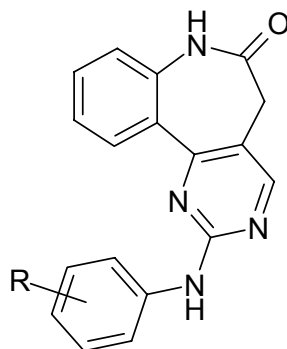
		VEGFR	VEGFR	Aurora	Aurora			
	R	-2	-3	A	B	TIE2	FAK	SRC
9o	3'-Cl, 4'-OH	0.035	0.038	0.35	2.3	0.48	0.80	1.4
9n	3'-OH	0.051	0.059	0.77	3.5	0.64	0.90	2.8
9m	3'-OH, 4'-OCH ₃	0.073	0.089	0.72	3.0	0.63	0.64	3.0
9i	4'-OH	0.080	0.097	2.1	-	1.2	3.2	64
9b	4'-OCH ₃	0.095	0.14	0.91	49	1.4	1.3	8.6
9l	4'-OC ₂ H ₅	0.13	0.17	2.0	-	2.9	3.1	6.7
9a	4'-H	0.14	0.16	11	-	-	55	-
9c	4'-Cl	0.19	0.21	2.1	-	65	6.4	-
9f	4'-CH ₃	0.19	0.30	-	-	33	19	38
9k	4'-Br	0.29	0.48	3.7	92	14	11	63
9e	4'-NO ₂	0.33	0.93	22	-	4.8	26	4.3
9d	4'-I	0.40	0.42	2.4	-	12	4.8	32
9q	2'-OH	0.53	0.42	5.8	40	2.9	2.9	13
9p	2'-CH ₃ , 4'-OH	1.2	0.76	39	73	11	2.5	5.0
9h	2'-Br	57	33	-	-	-	11	-
9g	2'-Cl	6.1	6.6	100	-	-	2.9	42
9j	freies Amin	8.3	16	73	-	33	-	49

^a Fehlende Werte (-) sind mit einem IC₅₀-Wert > 100 μM gleichzusetzen.

Die stärkste Hemmung bewirken die Pyrimidobenzazepinone **9** an den VEGF-Rezeptoren. Andere Kinasen werden in den meisten Fällen erst durch mindestens zehnfach höhere Konzentrationen gehemmt. In der Gruppe der VEGFR ist eine Selektivität für VEGFR-2 zu erkennen, denn bei 14 von 17 Verbindungen werden für VEGFR-3-Kinase höhere IC₅₀-Werte gefunden. Bei den Aurora-Kinasen ergibt sich eine eindeutige Präferenz der Hemmung für die Aurora A-Isoform, die durch niedrigere Konzentrationen als die Aurora B-Kinase inhibiert wird.

4.3.4 Ergebnisse des zellulären Assays mit den Pyrimidobenzazepinonen

Die Pyrimidobenzazepinone **9m**, **9n** und **9o** zeigten in den in vitro Testungen eine deutliche Kinase-inhibitorische Aktivität. Um zu überprüfen, ob sich dies auch in komplexeren biologischen Systemen als biologische Wirkung manifestiert, wurden die Verbindungen zusätzlich in zellulären Assays (Firma ProQinase GmbH, Freiburg) getestet. Dabei wurden Zellen verwendet, die jeweils eine der durch **9m**, **9n** und **9o** gehemmten Kinasen überexprimieren. Durch spezielle Analysenverfahren wurde bei diesen Tests untersucht, ob sich die Kinase-Inhibition durch die Verbindungen als Änderung der Zellfunktion auswirkt.



9

m: R = 3'-OH, 4'-OCH₃

n: R = 3'-OH

o: R = 3'-Cl, 4'-OH

Die Wirkung der Aurora B-Hemmung durch die drei Verbindungen **9m**, **9n** und **9o** in biologischen Systemen wurde an HT29-Zellen

(Kolon-Karzinom) in einem FACS-EndoR-Assay (FACS, engl.: Fluorescence-activated Cell Sorting) untersucht. Die Abkürzung EndoR steht für endoreduplizierende Zellen. Ein Anstieg des Anteils der EndoR-Population an der Gesamtzellpopulation ist ein Indiz für die Hemmung von Aurora B. Als Positivkontrolle für den EndoR-Assay wurde VX-680 (**53**) verwendet, welches eine deutliche Endoreduplikation bewirkte. Die untersuchten Verbindungen **9m**, **9n** und **9o** zeigten keinen Effekt auf die Endoreduplikation der HT29-Zellen (Daten nicht dargestellt).

Die zelluläre Aktivität von **9m**, **9n** und **9o** auf FAK wurde mit einem FAK-Autophosphorylierungs-Assay an FAK^{+/+}-MEF-Zellen (MEF, engl.: Murine Embryonic Fibroblasts) überprüft. Für keine der Testverbindungen **9m**, **9n** und **9o** konnte eine Reduktion der FAK-Autophosphorylierung nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt).

Auch die zelluläre Aktivität von **9m**, **9n** und **9o** auf VEGFR-2 und TIE2 wurde jeweils mit Hilfe geeigneter ELISA-Autophosphorylierungs-Assays getestet. Die VEGFR-2-Assays wurden an HUE/HUVEC-Zellen (HUE, engl.: Human Umbilical Vein Endothelium; HUVEC: Humane Umbilikalvenenendothelzellen), die TIE2-Assays an CHO-TIE2-Zellen (CHO, engl.: Chinese Hamster Ovary) durchgeführt. Als Referenzsubstanz wurde jeweils Staurosporin (**64**) verwendet. In beiden Testsystemen konnte eine Verminderung der Autophosphorylierung durch die Testverbindungen gezeigt werden, wobei die IC₅₀-Werte jedoch etwa zwei Größenordnungen über den IC₅₀-Werten der in vitro-Tests liegen (Tabelle 4-15).

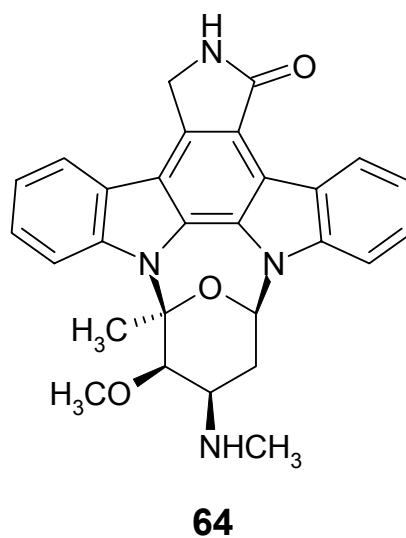


Tabelle 4-15: Hemmung der Autophosphorylierung von VEGFR-2 und TIE2 in zellulären Systemen (IC₅₀ [μM]) durch **9m**, **9n** und **9o**.

	VEGFR-2 ^a	TIE2 ^b
9m	3.8	42
9n	4.9	33
9o	14	> 100
64	0.088	0.070

^a Werte wurden mit HUE/HUVEC-Zellen ermittelt.

^b Werte wurden mit CHO-TIE2-Zellen ermittelt.

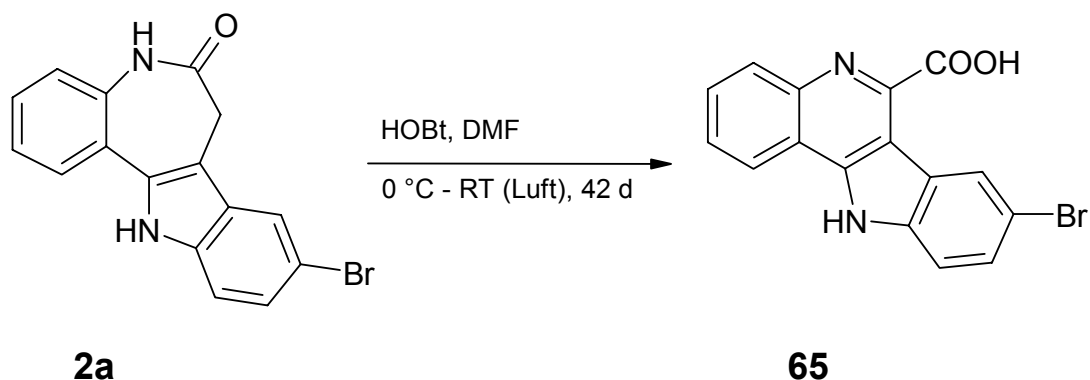
Als eine der Ursachen für die schwache Aktivität der Verbindungen auf zelluläre Systeme kann eine mangelnde Aufnahme der Verbindungen in die Zellen vermutet werden. Künftige Strukturmodifikationen an der Grundstruktur **9** müssen daher darauf gerichtet sein, die Zellgängigkeit der Verbindungen zu verbessern.

5 Stabilitätsuntersuchung mit Kenpaullon

Da bei biologischen Testungen häufig DMSO-Lösungen der zu untersuchenden Substanzen eingesetzt werden, sollte die Stabilität der Paullone in solchen Lösungen unter üblichen Labor- und Lagerbedingungen überprüft werden. Als Modellsubstanz wurde Kenpaullon (**2a**) gewählt und daraus verschiedene DMSO-Lösungen hergestellt. Für Probe I wurde Kenpaullon in DMSO gelöst und anschließend bei Raumtemperatur gelagert. Probe II ist eine DMSO-Lösung, der eine geringe Menge Wasser zugesetzt und die dann ebenfalls einer Lagerung bei Raumtemperatur unterzogen wurde. Bei Probe III handelt es sich um eine DMSO-Lösung, die bei -20 °C gelagert wurde. Erste Veränderungen ließen sich für die Proben I und II nach etwa vier bis fünf, für Probe III nach etwa 15 Wochen mittels ¹H-NMR-Spektroskopie nachweisen.

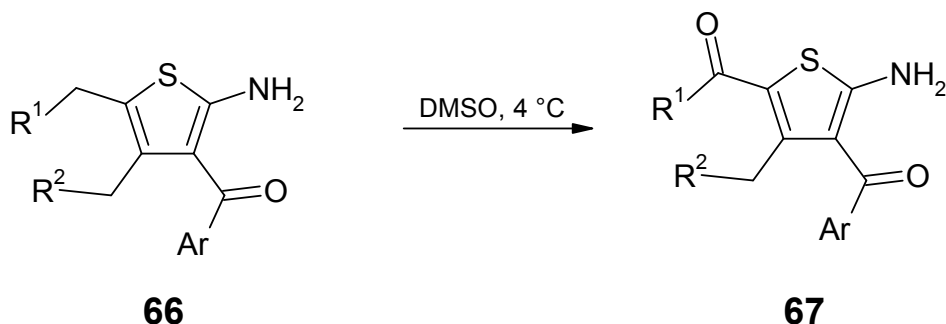
Pies zeigte im Rahmen ihrer Dissertation, dass sich Kenpaullon (**2a**) in Gegenwart von Radikalstartern und Luftsauerstoff oxidativ durch eine Ringverengung zu der 8-Brom-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**65**) umwandelt.²⁹ Die von Pies beschriebene Methode zur Darstellung von **65** wurde im Rahmen dieser Arbeit modifiziert und wie in Schema 5-1 dargestellt durchgeführt.

Schema 5-1: Darstellung der Indolo[3,2-c]chinolin-6-carbonsäure **65** aus Kenpaullon.



Auch für die Zersetzung von Kenpaullon unter den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Lagerbedingungen in DMSO-Lösung liegen oxidative Prozesse nahe. Joshi und Mitarbeiter konnten zeigen, dass 4,5-Dialkylthiophene **66** durch DMSO während der Lagerung, vermutlich über einen radikalischen Mechanismus, regioselektiv am Alkylrest in Position 5 zu den entsprechenden Carbonylverbindungen **67** oxidiert werden (Schema 5-2).¹³⁶ Um den zeitlichen Ablauf der Zersetzungsreaktionen von Kenpaullon (**2a**) näher beschreiben zu können, wurden HPLC-Untersuchungen mit einer der Probe II entsprechenden Lösung angeschlossen. Diese Untersuchungen umfassten einen Zeitraum von insgesamt 48 Wochen. Es sollte vor allem überprüft werden, ob **65** als Zersetzungsprodukt gebildet wird.

Schema 5-2: Die von Joshi et al. beschriebene und durch DMSO bedingte Oxidation der Dialkylthiophene **66**.¹³⁶



Bei der HPLC-Untersuchung der Probe II konnte die Chinolin-carbonsäure **65** über ihr UV-Spektrum (Abbildung 5-1) mit Hilfe eines Dioden-Array-Detektors (DAD) als ein Zerfallsprodukt identifiziert werden. Die Zuordnung des Peaks der Verbindung **65** in den Chromatogrammen der Probe II wurde außerdem durch Zugabe von unabhängig dargestelltem **65** zu den Probenlösungen im Rahmen von „Spiking-Experimenten“ gesichert. Nach 16 Wochen Lagerung wurde Verbindung **65** mit einem Flächenanteil von ca. 41% (100%-Methode) als Hauptbestandteil der Probe II und damit als wichtigstes Zersetzungsprodukt identifiziert (Abbildung 5-2).

Abbildung 5-1: UV-Spektrum der Chinolincarbonsäure **65**.

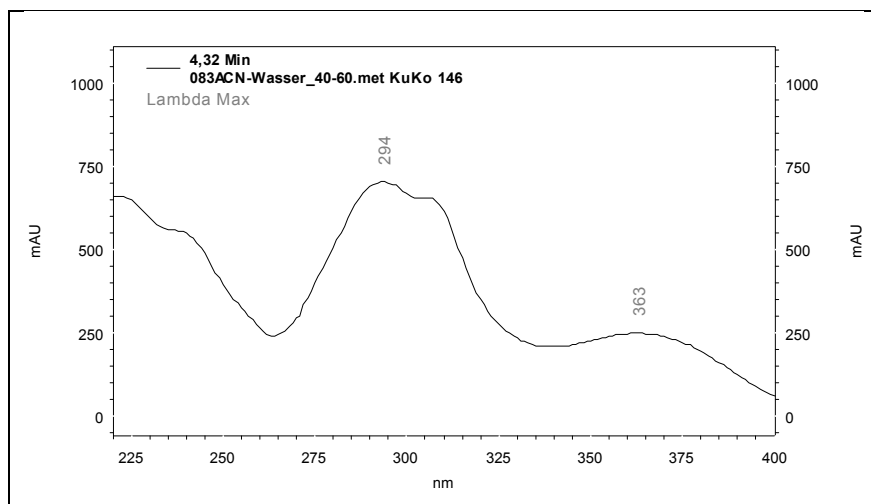
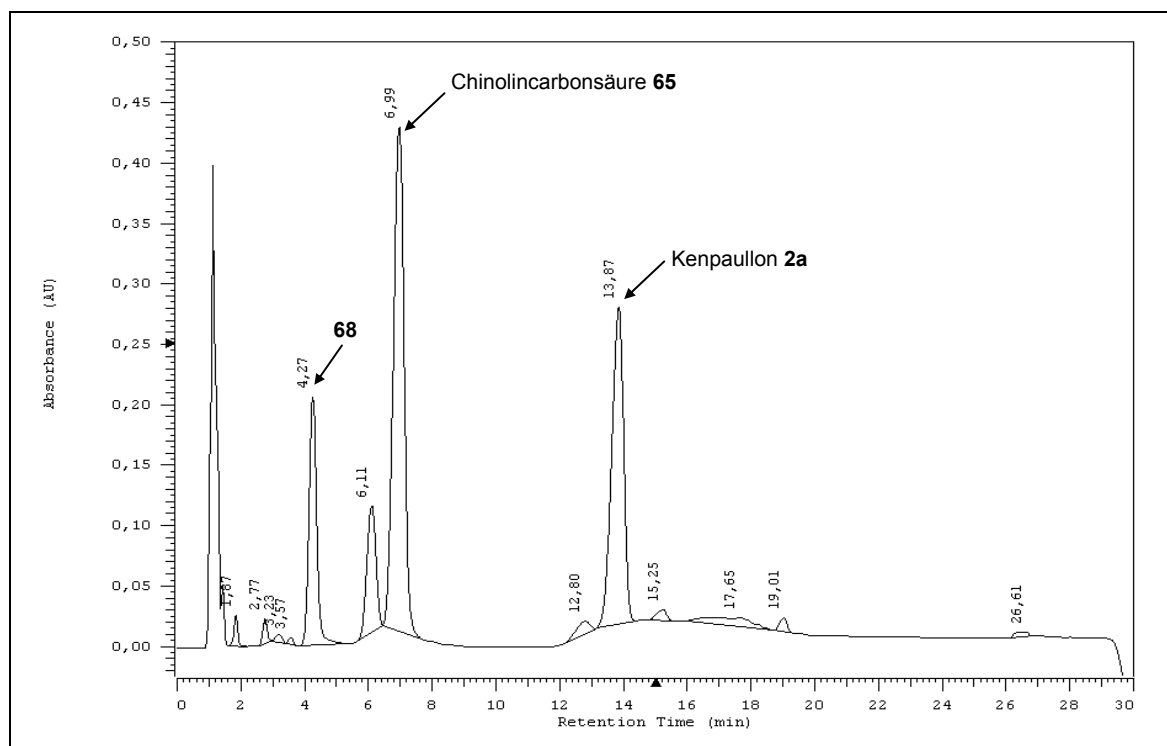
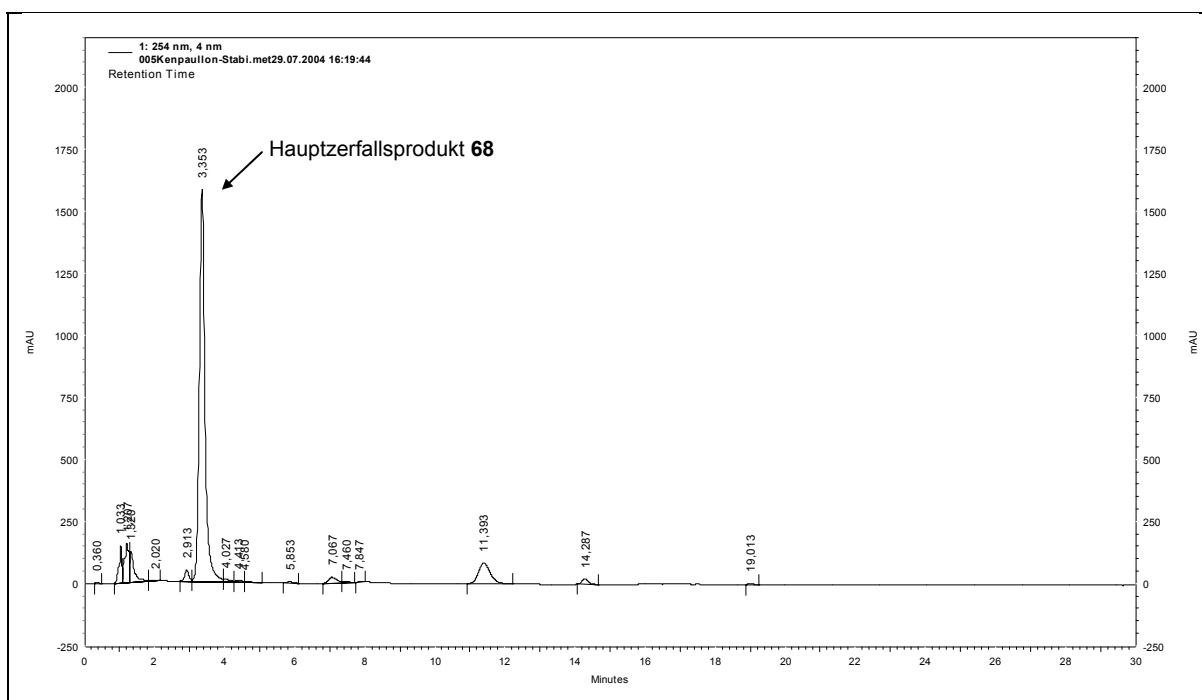


Abbildung 5-2: Chromatogramm der Kenpaullon-Stabilitätsprobe nach 16 Wochen.



Im weiteren Verlauf der Lagerung nahm die relative Fläche von **65** wieder ab, während der Anteil einer zunächst unbekannten Verbindung **68** mit der Retentionszeit von 4.27 Minuten (Abbildung 5-2) zunahm. Nach 48 Wochen stellte **68** mit einem Flächenanteil von 82% das Hauptzerfallsprodukt dar (RT 3.41 Min, Abbildung 5-3). Dieses Hauptzerfallsprodukt lässt sich insbesondere über sein UV-Spektrum (Abbildung 5-4) deutlich von der Chinolincarbonsäure **65** unterscheiden. Abbildung 5-5 spiegelt den zeitlichen Verlauf der Zersetzung von Kenpaullon (**2a**) wieder. Auf der Grundlage dieser Beobachtungen kann vermutet werden, dass **65** das Intermediat bei der Bildung des Hauptzerfallsprodukts **68** ist.

Abbildung 5-3: Chromatogramm der Kenpaullon-Stabilitätsprobe nach 48 Wochen.



Elutionsmittel-Gradient: Acetonitril:Wasser/TFA (pH 1.5) 35:65 – Acetonitril:Wasser/TFA (pH 1.5) 55:45 (Gradient zwischen 9-15 Minuten), Detektionswellenlänge 254 nm.

Abbildung 5-4: UV-Spektrum des Hauptzerfallsprodukts **68**.

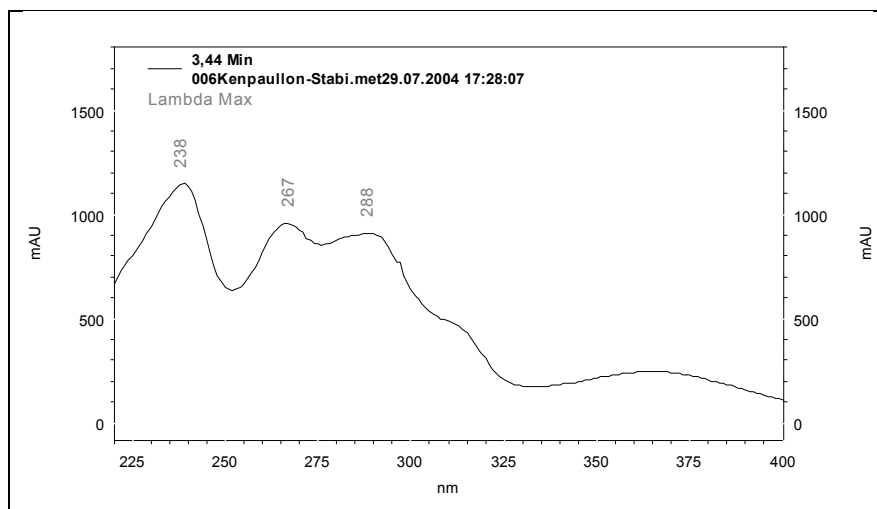
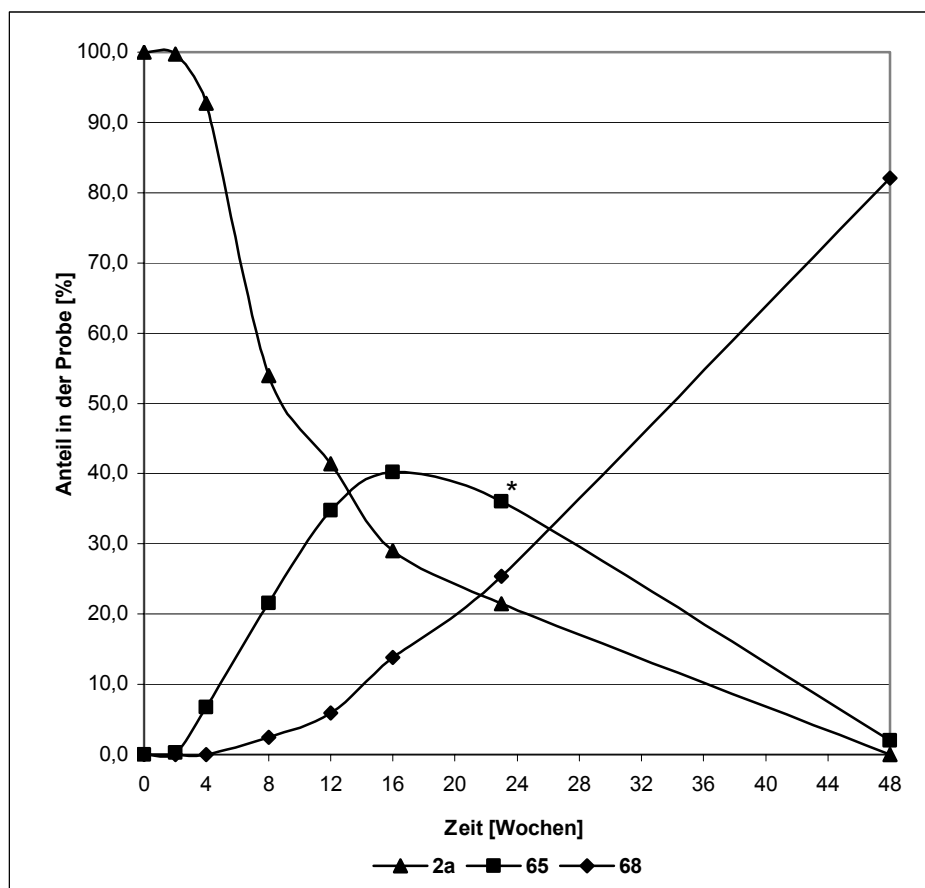


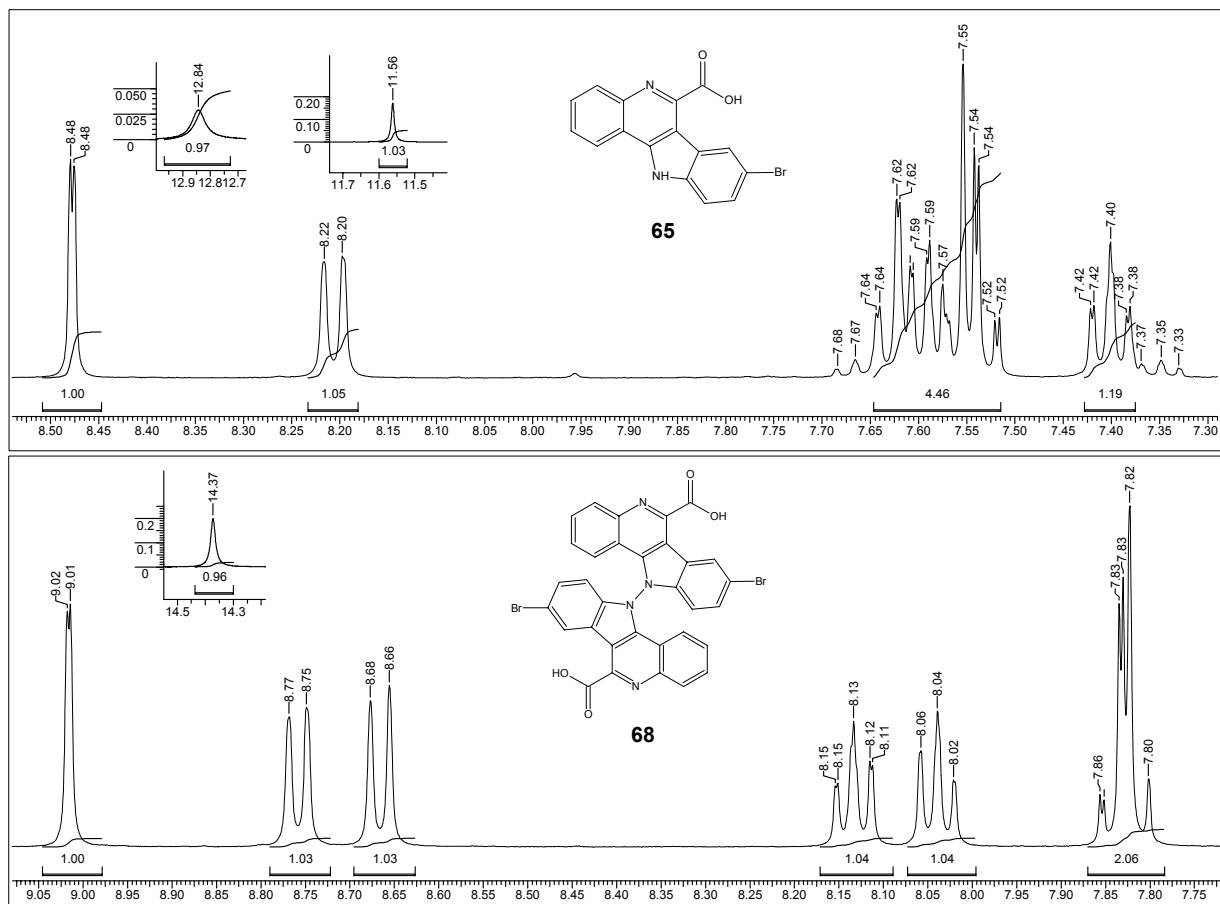
Abbildung 5-5: Zeitlicher Verlauf der Kenpaullon-Zersetzung im Zeitraum von 48 Wochen.



* Geschätzter Wert, da sich zwei Peaks verschiedener Substanzen überlagern.

Weiteres Ziel dieser Untersuchungen war es, das Hauptzerfallsprodukt zu identifizieren. Die Signalaufspaltung in den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von **68** gleicht einer der Chinolincarbonsäure **65** entsprechenden Signalaufspaltung, allerdings fehlt im ^1H -NMR-Spektrum ein Signal für das entsprechende Indol-NH. Außerdem unterscheiden sich die Spektren von **65** und **68** deutlich im Hinblick auf die chemische Verschiebung der Signale (Abbildung 5-6). In der Literatur lassen sich Beispiele finden, die belegen, dass aus Indolverbindungen durch oxidative und photochemische Prozesse Dimere (**69a-c**) gebildet werden (Abbildung 5-7).¹³⁷⁻¹³⁹

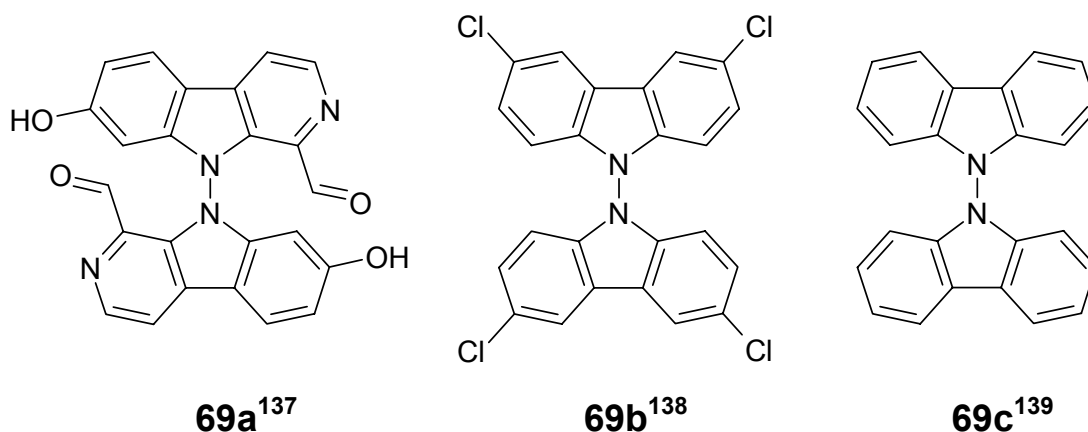
Abbildung 5-6: ^1H -NMR-Spektren^{a,b} (Ausschnitt) der Chinolin-carbonsäure **65**²⁹ (oben) und des Hauptzerfallsprodukts **68** (unten).



^a Lösungsmittel: **65**: $[\text{D}_6]\text{DMSO}$; **68**: $[\text{D}_6]\text{DMSO} + \text{TFA}$

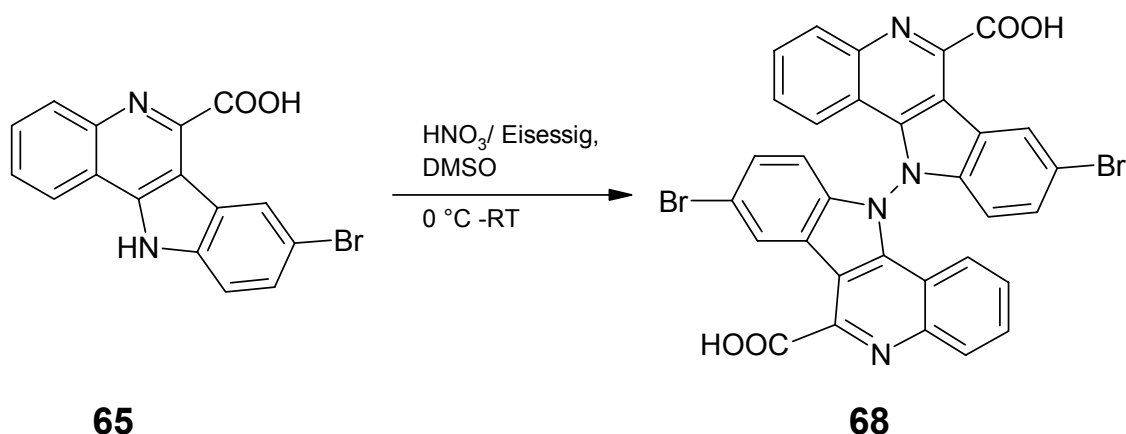
^b 400 MHz, interner Standard: TMS

Abbildung 5-7: Literaturbekannte, unter oxidativen Bedingungen gebildete „Indol-Dimere“ **69 a-c**.



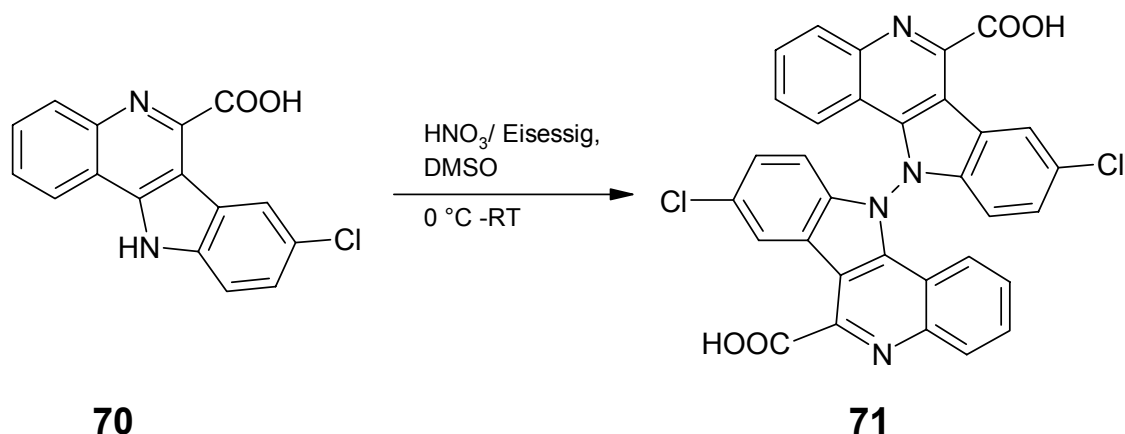
Sollte die Chinolincarbonsäure **65** das Intermediat der Bildung des Hauptzerfallsprodukts **68** sein, müsste sich **65** oxidativ zu **68** umsetzen lassen. Für diese Umsetzung wurden die von Ponce et al. beschriebenen Bedingungen¹³⁷ gewählt und nach Schema 5-3 durchgeführt. Anstelle von THF wurde als Lösungsmittel das auch bei der Stabilitätsprüfung eingesetzte DMSO gewählt. Aus den Daten der ¹H-NMR-Spektren, HPLC-Untersuchungen und dem Vergleich der UV-Spektren ließ sich beweisen, dass es sich bei dem aus der Chinolincarbonsäure **65** erzeugten Produkt um Verbindung **68** handelt und **65** tatsächlich das Intermediat der Bildung des Hauptzerfallsprodukts **68** ist. Allerdings lieferte dieses Experiment noch nicht den Beweis der in Schema 5-3 postulierten Struktur der Verbindung **68**.

Schema 5-3: Oxidative Dimerisierung der Chinolincarbonsäure **65** nach einer nach Ponce et al.¹³⁷ modifizierten Methode.



Das Produkt **68** ließ sich aufgrund seiner sehr geringen Löslichkeit weder durch Umkristallisation noch durch Säulenchromatographie reinigen, weshalb keine aussagekräftige Elementaranalyse erhalten werden konnte. Aus diesem Grund sollte versucht werden, durch den Austausch von Brom durch Chlor ein besser lösliches Derivat von **68** zu gewinnen. Dazu wurde die 8-Chlor-11*H*-indolo[3,2-*c*]-chinolin-6-carbonsäure **70** analog der in Schema 5-1 beschriebenen Methode dargestellt und anschließend zu dem entsprechenden Dimer **71** umgesetzt (Schema 5-4).

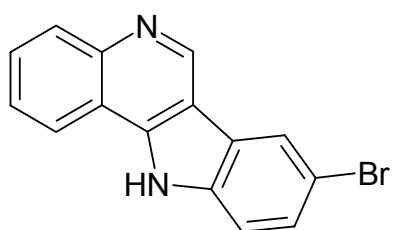
Schema 5-4: Oxidative Dimerisierung der Chinolincarbonsäure **70**.



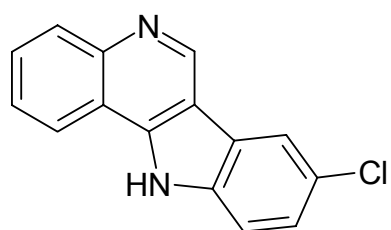
Die Löslichkeit der Chlorverbindung **71** unterschied sich jedoch nicht von der Löslichkeit des Bromderivats **68**, so dass auch Verbindung **71** nicht soweit gereinigt werden konnte, dass eine korrekte Elementaranalyse erhalten wurde.

Massenspektroskopische Untersuchungen, vornehmlich EI und ESI-Experimente, konnten keinen Beweis für die postulierte Struktur von **68** und **71** liefern. In den Massenspektren ließen sich keine „Molpeaks“ für **68** bzw. **71** identifizieren, stattdessen wurden Signale beobachtet, die den durch Decarboxylierung aus **65** bzw. **70** gebildeten Indolo[3,2-c]chinolinen **72** bzw. **73** entsprechen. Für die Strukturen **68** bzw. **71** mit Carboxylfunktion sprechen jedoch die Ergebnisse der HPLC-, NMR- und IR-Untersuchungen. Außerdem erscheint eine Decarboxylierung unter den milden Bedingungen der Stabilitätsuntersuchung unwahrscheinlich.

Die Struktur der Verbindungen **68** und **71** konnte somit bislang nicht eindeutig geklärt werden, die analytischen Daten sprechen jedoch für eine Dimerbildung.



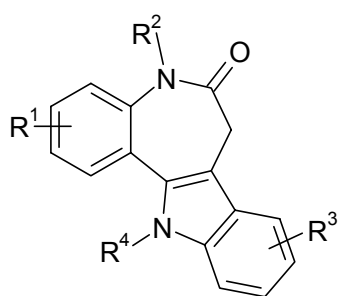
72



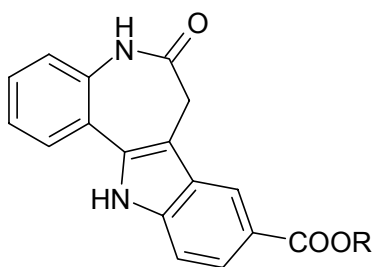
73

6 Zusammenfassung

Paullone (7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one) (**2**) sind CDK-Inhibitoren (CDK, engl.: cyclin-dependent kinase) mit antiproliferativer Aktivität gegenüber Tumorzellen. Als weitere Targets konnten durch Affinitätsuntersuchungen mit immobilisierten Paullonen Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) und Malatdehydrogenase (MDH) identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen im Hinblick auf die Hemmung der Maladehydrogenase, insbesondere der mitochondrialen Isoform (mMDH), durch Paullone (**2**) und verwandte *d*-anellierte Pyrazolobenzazepinone **8** und Pyrimidobenzazepinone **9** durchgeführt. Für die neuartigen Strukturen **8** und **9** wurden Synthesewege ausgehend vom 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) etabliert.

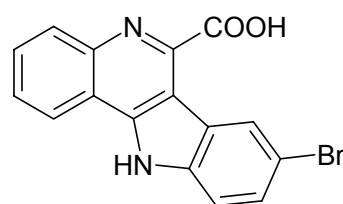


2



2p (R = Hexyl-)

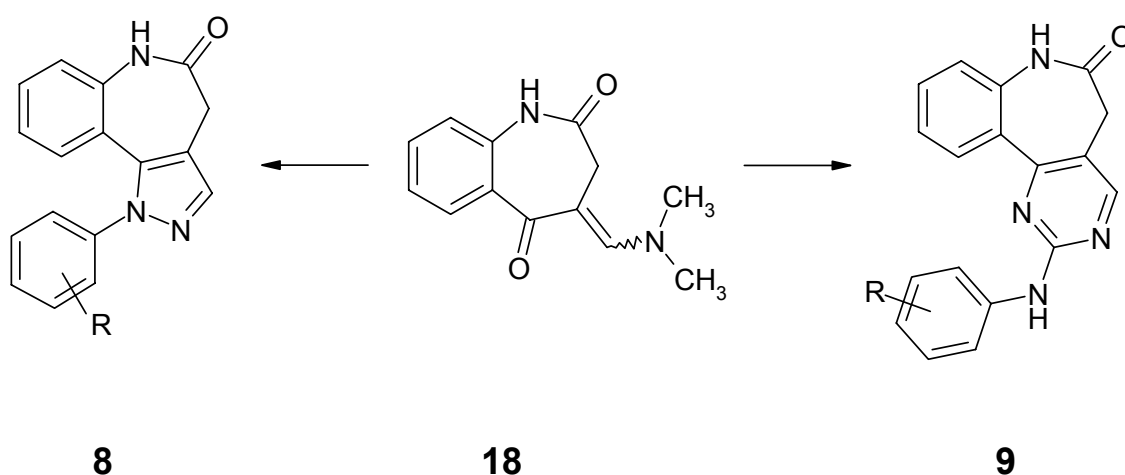
2q (R = Octyl-)



65

Es wurde gezeigt, dass Paullone (**2**) die mitochondriale (mMDH) und die cytosolische MDH (cMDH) im mikromolaren Konzentrationsbereich hemmen, wobei Selektivität für mMDH

gefunden wurde. Der potenteste Vertreter dieser Stoffklasse ist der 9-Carbonsäureoctylester **2q** ($IC_{50}(mMDH) = 2.7 \mu M$). Klare Struktur-Aktivitätsbeziehungen ließen sich für die mMDH-Inhibition durch Paullone nicht herleiten. Allerdings konnte für die Gruppe der 9-substituierten Paullone eine positive Korrelation ($r = 0.7895$) zwischen der Lipophilie (cLogP-Wert) und der mMDH-Hemmung (pIC_{50} -Wert) detektiert werden. In Kinetikuntersuchungen mit dem 9-Carbonsäurehexylester **2p** wurde ein NAD-kompetitiver Mechanismus für die mMDH-Inhibition nachgewiesen. Die Paullon-Strukturanaloga **8** und **9** zeigten keine MDH-inhibitorische Aktivität.



Um die neuen Verbindungen der Substanzklassen **8** und **9** bezüglich ihrer antiproliferativen Aktivität möglichst umfassend zu charakterisieren, wurden neben der MDH-Testung auch Untersuchungen an tumorrelevanten Proteinkinasen und Tumorzellen durchgeführt. Die Pyrazolobenzazepinone **8** wiesen eine außergewöhnlich hohe antiproliferative Aktivität gegenüber Tumorzellen auf. Eine ausgeprägte Kinase-inhibitorische Aktivität konnte jedoch nicht festgestellt werden, so dass andere

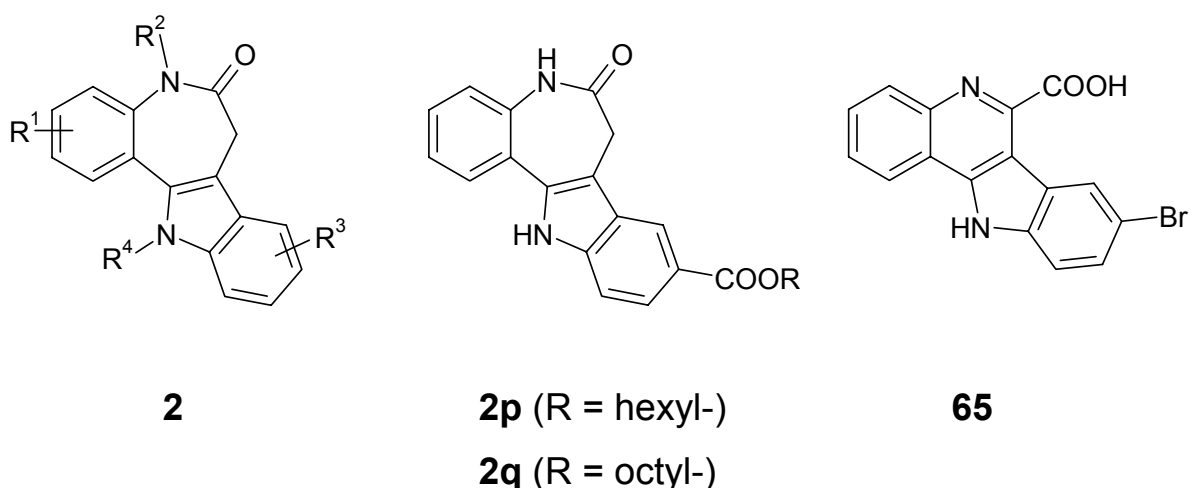
Mechanismen für die in vitro Antitumoraktivität von **8** verantwortlich sein müssen.

Die Pyrimidobenzazepinone **9** hingegen zeichneten sich durch ihre hohe Proteinkinase-inhibitorische Aktivität aus. Besonders die Tyrosinkinasen VEGFR-2 und VEGFR-3 werden durch **9** in nanomolaren Konzentrationen gehemmt. In zellulären Phosphorylierungs-Assays wurden etwa 100-fach schwächere Aktivitäten dieser Verbindungen gegen VEGFR-2 und VEGFR-3 gefunden.

Bei Stabilitätsuntersuchungen mit Kenpaullon [$R^3 = 9\text{-Br}$] (**2a**) konnte gezeigt werden, dass Paullone in DMSO-Lösungen über längere Lagerzeiten in Gegenwart von Luftsauerstoff instabil sind. Die 8-Brom-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**65**) wurde als Intermediat bei der Bildung eines Hauptzerfallsprodukts nachgewiesen, dessen Struktur noch nicht eindeutig belegt werden konnte.

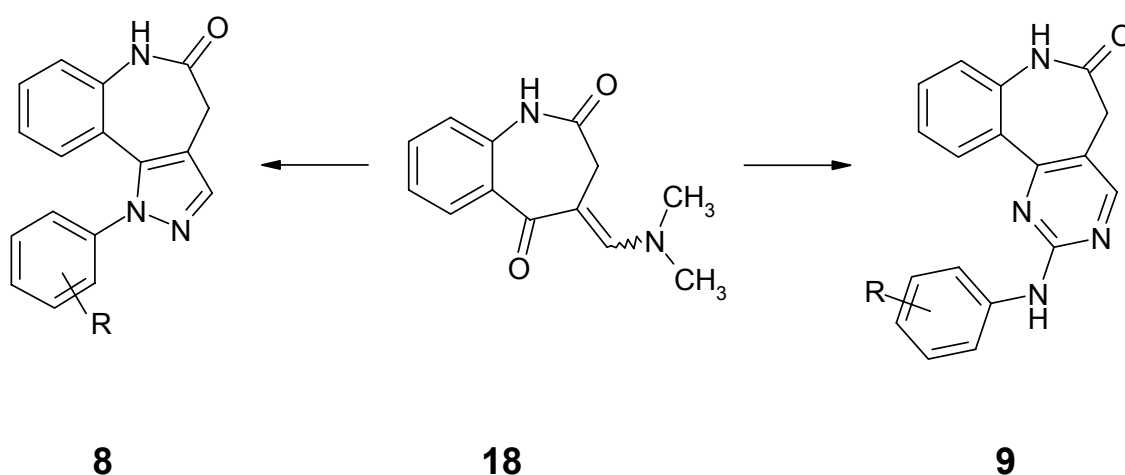
7 Summary

Paullones (7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-ones) (**2**) are CDK inhibitors (CDK: cyclin-dependent kinase) with antiproliferative activity for cancer cells. Based on affinity studies with immobilized paullones glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) and malate dehydrogenase (MDH) were identified as further targets of paullones. In the context, paullones and related *d*-annelated pyrazolobenzazepinones **8** and pyrimidobenzazepinones **9** were investigated with regard to the MDH-inhibition, particularly of the mitochondrial isoform. Starting from the 4-[(dimethylamino)-methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dione (**18**) syntheses for the novel structures **8** and **9** were established.



While Paullones (**2**) have been identified to inhibit both mitochondrial (mMDH) and cytoplasmic malate dehydrogenase (cMDH) by micromolar concentrations, selectivity for mMDH was found. Within the group of paullones the 9-carboxylic acid octyl ester **2q** is the most potent MDH-inhibitor ($IC_{50}(\text{mMDH}) = 2.7 \mu\text{M}$). Evident

structure-activity relationships could not be derived. However, a positive correlation ($r = 0.7895$) between the calculated lipophilicity (cLogP-value) and the mMDH-inhibitory activity (pIC_{50} -value) was detected. Kinetic studies with the 9-carboxylic acid hexyl ester **2p** demonstrated a NAD-competitive mechanism for mMDH-inhibition. The paullone-like compounds **8** and **9** failed to show MDH-inhibitory activity.



For a comprehensive characterisation of the novel classes of substances **8** and **9** concerning their antiproliferative activity, further studies with tumor relevant protein kinases and cancer cells were accomplished in addition to the MDH-testing. The pyrazolobenzazepinones **8** exhibited an exceptional strong antiproliferative activity for cancer cells. However, a high kinase inhibitory activity was not detected. Hence, other mechanisms are responsible for the in vitro antitumor activity of **8**.

In contrast the pyrimidobenzazepinones **9** showed a high inhibitory activity for protein kinases. Especially the tyrosine kinases VEGFR-2 and VEGFR-3 were inhibited by nanomolar concentrations of **9**. In

cellular phosphorylation assays compounds **9** showed a 100-fold lower activity against VEGFR-2 and VEGFR-3.

Based on stability studies with kenpaullone [$R^3 = 9\text{-Br}$] (**2a**) it has been shown that paullones in DMSO solutions are unstable under long-term storage and aerobic conditions. The 8-bromo-11*H*-indolo[3,2-*c*]quinoline-6-carboxylic acid (**65**) proved to be the main intermediate during the decomposition reaction. The chemical structure of the secondary product in this process has not yet been definitely determined.

8 Experimenteller Teil

8.1 Allgemeines

Mikrowelle:

CEM Fokussiertes Mikrowellen™ Synthese System, Typ Discover;
Chem Driver™ Application Software Program; Reaktionsgefäße:
10 ml mit Teflonseptum (geschlossenes System); Fa. CEM GmbH,
Kamp-Lintfort

Jun-Air Kompressor, Blue Line Model 4; Fa. Jun-Air International,
Nørresundby, Dänemark

Schmelzpunkte:

IA 9100, Elektrothermal, Southend-on-Sea, Essex, Großbritannien

IR-Spektren:

Thermo Nicolet FT-IR 200 (vermessen als KBr-Presslinge);
Fa. Thermo Nicolet, Madison, WI, USA

Kernresonanzspektroskopie:

¹H-NMR (400 MHz) und ¹³C-NMR (100.6 MHz):

Bruker Avance DRX-400 (NMR-Laboratorien der Chemischen
Institute der TU Braunschweig; einschließlich der NOE- und DEPT-
Messungen, sowie der HSQC- und HMBC-Spektren)

Interner Standard: Tetramethylsilan (TMS)

Angabe der chemischen Verschiebungen in ppm nach der δ_{TMS} -
Skala; Ermittlung der Protonenverhältnisse durch Integration

Abkürzungen für Signalmultiplizitäten: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quint = Quintett, m = Multiplett

Elementaranalysen:

CE Instruments FlashEA[®] 1112 Elementar Analyzer; Fa. C₃ Analysentechnik GmbH, Haar bei München

Massenspektrometrie:

Finnigan-MAT 90 (Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig)

Elektronenstoß-Ionisation (EI)-MS: Ionisationsenergie 70 eV

Elektrospray-Ionisation (ESI)-MS

UV-Spektroskopie:

PU 8700 Series UV/Visible Spectrophotometer mit temperierbarem Küvettenhalter; Fa. Philips Scientific, Cambridge, Großbritannien

SPECORD 200 UV/VIS Spektrometer mit temperierbarem Küvettenhalter; Fa. Analytik Jena, Jena

Thermostat Haake FE2; Fa. Gebr. Haake, Berlin

Küvetten: 1.5 ml Halbmikro-Einmalküvetten aus PMMA (Schichtdicke: 1 cm); Fa. Brand GmbH & Co. KG, Wertheim und Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

HPLC-Chromatographie:

Merck Hitachi L-7000 series, DAD Detektor L-7455, Autosampler L-7200, Pumpe L-7100, Fa. Merck Hitachi, Darmstadt

Merck Hitachi LaChrom Elite, DAD Detektor L-2450, Autosampler L-2200, Pumpe L-2130, Fa. Merck Hitachi, Darmstadt

Trennsäule: LiChroCART 125-4, LiChrospher 100 RP-18 (5 µm), Fa. Merck, Darmstadt

Probenvorbereitung: ca. 1 mg Substanz werden in 500 µl DMSO gelöst, die Lösung wird anschließend 1:10 mit DMSO verdünnt

Auftragevolumen: 10 µl; Flussrate: 1.000 ml/min; Detektion: 254/280 nm, Gesamtlaufzeit: 15 min, Nettoretentionszeit (t_s), Totzeit (t_m) bezogen auf DMSO; Elutionsmittel: ACN:H₂O- und ACN:H₂O/TFA (pH 1.5)-Gemische

Herstellung H₂O/TFA (pH 1.5): Aqua bidest mit Trifluoressigsäure auf pH 1.5 eingestellt

Röntgenstrukturanalysen:

Datensammlung: Die Kristalle wurden in Inertöl auf Glasfäden montiert, in den Kaltgasstrom des Diffraktometers (Bruker SMART 1000 CCD (Institut für Anorganische und Analytische Chemie der TU Braunschweig)) gebracht und mit monochromatisierter Mo-K α -Strahlung gemessen.

Strukturlösung: direkte Methoden

Strukturverfeinerung und weitere numerische Einzelheiten: s. Kapitel 8.2 Synthese/Analytische Daten (Kristalldaten und Strukturverfeinerung)

Programmsystem: SHELXL-97 (G.M. Sheldrick, Universität Göttingen)

Dünnschichtchromatographie:

DC-Mikroarten Polygram[®] Sil G/UV₂₅₄, Fa. Machery-Nagel

Detektion unter UV-Licht bei 254 nm

Säulenchromatographie:

Kieselgel 60 (unter 0.063 mm), Fa. Merck, Darmstadt

Reinigung und Trocknung von Lösungsmitteln:

Die Reinigung und Trocknung von Lösungsmitteln erfolgte nach publizierten Methoden.¹⁴⁰

Berechnung der cLogP-Werte:

Die Berechnung der kalkulierten cLogP-Werte erfolgte mit dem ACD Labs-Programm „LogP data base“ (Version 6.00, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada). Die zu berechnenden Moleküle wurden mit ACD Labs „ChemSketch“ gezeichnet und mit dem „LogP data base“-Algorithmus berechnet. Der cLogP-Wert setzt sich aus LogP-Werten einzelner in der Datenbank abgelegter Molekülfragmente zusammen. Dem Algorithmus liegt eine Datenbank von 18412 Strukturen, deren LogP-Werte experimentell bestimmt wurden, zugrunde. Der cLogP-Wert wird mit einem Konfidenzintervall von 95% angegeben. Bei tautomeren Molekülen, ionischen Verbindungen bzw. Verbindungen die ggf. als Ion vorliegen oder Molekülen mit nicht berechenbaren intramolekularen Wechselwirkungen und unbekannten Fragmenten werden Warnhinweise durch das Programm ausgegeben. Die cLogP-Werte dieser Teilstrukturen werden geschätzt und zeichnen sich durch eine hohe Spannbreite (hohe \pm -Werte) aus.

8.2 Synthese/Analytische Daten

Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV 1): Synthese der 1-Aryl-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepinone (**8 a-p**)

1 mmol (0.230 g) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) wird mit 1.5 mmol Phenylhydrazin* (**29 a-p**) (bzw. mit 1.5 mmol des entsprechenden Phenylhydrazin-Hydrochlorids und 1.5 mmol (0.123 g) Natriumacetat) in 10 ml Eisessig für ca. 1 h bei 70 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird auf 20 ml 5proz. Natriumacetat-Lösung gegossen. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit viel Wasser gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert.

* Gefahrstoff! Siehe auch Anhang zu Kap. 8.2.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 (AAV 2): Synthese der 4-[(2-Phenylhydrazino)methylen]-3,4-dihydro-1*H*[1]benzazepin-2,5-dione (**31a-q**)

1 mmol (0.230 g) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) wird mit 1.5 mmol Phenylhydrazin* (**29a-q**) (bzw. mit 1.5 mmol des entsprechenden Phenylhydrazin-Hydrochlorids und 1.5 mmol (0.123 g) Natriumacetat) in 15 ml Eisessig für ca. 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird auf 30 ml 5proz. Natriumacetat-Lösung gegossen, der Niederschlag abgesaugt, mit viel Wasser gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert.

* Gefahrstoff! Siehe auch Anhang zu Kap. 8.2.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 (AAV 3): Synthese der 7,12-Dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one (Paullone, **2b**, **d** und **e**)

Methode A:

2 mmol (0.350 g) 1*H*-[1]Benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dion (**19**) werden mit 3 mmol Phenylhydrazin* (**29**) (bzw. mit 3 mmol des entsprechenden Phenylhydrazin-Hydrochlorids und 3 mmol (0.246 g) Natriumacetat) in 20 ml Eisessig für ca. 1 h bei 70 °C gerührt. Anschließend werden 0.2 ml konz. Schwefelsäure zugetropft und für eine weitere Stunde bei 70 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird auf 20 ml 5proz. Natriumacetat-Lösung gegossen, der Niederschlag abgesaugt, mit viel Wasser gewaschen und ggf. aus Ethanol umkristallisiert.

Methode B:

1 mmol (0.175 g) 1*H*-[1]Benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dion (**19**), 1.5 mmol Phenylhydrazin* (**29**) (bzw. 1.5 mmol des entsprechenden Phenylhydrazin-Hydrochlorids, 1.5 mmol (0.123 g) Natriumacetat) und 0.2 ml Eisessig werden in 3 ml Wasser in einem geschlossenen Reaktionsgefäß für 10 Minuten bei 180 °C in der Synthesemikrowelle (150 Watt, Maximaldruck: 280 Psi) gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt und aus Ethanol umkristallisiert.

* Gefahrstoff! Siehe auch Anhang zu Kap. 8.2.

Methode C:

1 mmol (0.265 g) 5-Phenylhydrazono-4,5-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2(3*H*)-on (**37**) wird für 30 Minuten in 3 ml Wasser in einem geschlossenen Reaktionsgefäß bei 180 °C in der Synthese-

mikrowelle (300 Watt, Maximaldruck: 280 Psi) gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt und ggf. aus Ethanol umkristallisiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 (AAV 4): Synthese der 2-Anilino-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-one (**9a-q**)

Methode A:

1 mmol (0.230 g) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**), 1.2 mmol des entsprechenden (Phenyl)-Guanidiniumnitrats (**43**) und 1.2 mmol (0.048 g) Natriumhydroxid werden in 5 ml 2-Propanol für ca. 8 h zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Niederschlag abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus Ethanol oder Ethylacetat umkristallisiert.

Methode B:

1 mmol (0.230 g) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**), 1.2 mmol des entsprechenden (Phenyl)-Guanidiniumnitrats und 1.2 mmol (0.048 g) Natriumhydroxid werden in 5 ml 2-Propanol in einem geschlossenen Reaktionsgefäß bei 150 °C für ca. 30-60 Minuten in der Synthesemikrowelle (150 Watt, Maximaldruck: 250 Psi) gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Niederschlag abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus Ethanol oder Ethylacetat umkristallisiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 5 (AAV 5): Synthese der Arylguanidiniumnitrate (**43a-q**)ⁱ

Methode A:

40 mmol des entsprechenden Anilinderivats* (**44a-q**) werden in 10-15 ml Ethanol gerührt. Anschließend werden zunächst 3.6 ml konz. Salpetersäure (65%) und dann 5 ml einer wässrigen 50proz. Cyanamid-Lösung zugetropft. Das Gemisch wird für ca. 18 h zum Rückfluss erhitzt. Der nach dem Erkalten entstandene Niederschlag wird abgesaugt und aus 2-Propanol umkristallisiert. Sollte die Niederschlagsbildung ausbleiben, wird der Ansatz gekühlt und auf ca. 200 ml gekühlten Diethylether gegossen. Anschließend wird der entstandene Kristallbrei zügig abgesaugt. Es ist darauf zu achten, dass der Niederschlag mit Ether bedeckt bleibt. Die Reinigung erfolgt ebenfalls durch Umkristallisation aus 2-Propanol.

Methode B:

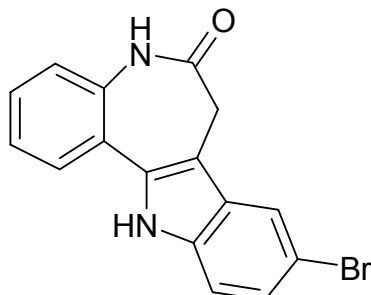
10 mmol des entsprechenden Anilinderivats* (**44a-q**) werden in 3 ml Ethanol gerührt. Anschließend werden zunächst 1.0 ml konz. Salpetersäure (65%) und dann 1.3 ml einer wässrigen 50proz. Cyanamidlösung zugetropft. Das Gemisch wird in einem geschlossenen Reaktionsgefäß bei 150 °C für 15-60 Minuten in der Synthesemikrowelle (150 Watt, Maximaldruck: 250 Psi) gerührt. Der Ansatz wird gekühlt und auf ca 50 ml gekühlten Diethylether gegossen. Anschließend wird der entstandene Kristallbrei zügig abgesaugt. Es ist darauf zu achten, dass der Niederschlag mit Ether

ⁱ Die Arylguanidiniumnitrate wurden in Zusammenarbeit mit Bianca Berger hergestellt.

bedeckt bleibt. Die Reinigung erfolgt durch Umkristallisation aus 2-Propanol.

* Gefahrstoff! Siehe auch Anhang zu Kap. 8.2.

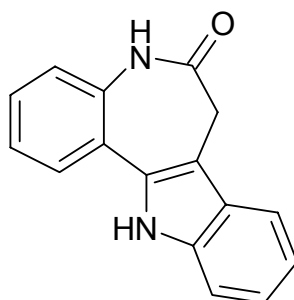
9-Brom-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on
(Kenpaullon, **2b**)



Nach AAV 3 (Methode B) aus 1 mmol (175 mg) 1*H*-[1]Benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dion (**19**) und 1.5 mmol (268 mg) 4-Bromphenylhydrazin-Hydrochlorid (**29b**). Man erhält 247 mg (76%) eines beigefarbenen Pulvers.

Schmp.: > 380 °C (Lit.⁶⁵: > 330 °C); HPLC: t_s : 2.55 min; Reinheit: 95.2%/91.6% [ACN:H₂O (50:50); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m (DMSO): 1.02 min; 100%-Methode]

7,12-Dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (Paullon, **2d**)



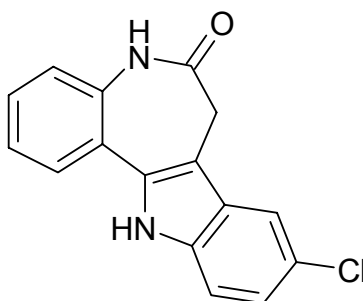
Nach AAV 3 (Methode A) aus 1 mmol (179 mg) 1*H*-[1]Benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dion (**19**) und 1.5 mmol (150 μ l) Phenylhydrazin (**29a**). Man erhält 205 mg (81%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: > 330 °C (Lit.⁶⁵: > 330 °C); HPLC: t_s : 2.45 min; Reinheit: 97.9%/97.3% [ACN:H₂O (40:60); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m (DMSO): 1.03 min; 100%-Methode]

Nach AAV 3 (Methode C) aus 1 mmol (268 mg) 5-Phenylhydrazono-4,5-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2(3*H*)-on (**37**). Man erhält 156 mg (63%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: > 330 °C (Lit.⁶⁵: > 330 °C); HPLC: t_s : 2.94 min; Reinheit: 98.3%/99.1% [ACN:H₂O (40:60); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/ 280 nm; t_m (DMSO): 1.03 min; 100%-Methode]

9-Chlor-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (9-Chlor-paullon, **2e**)

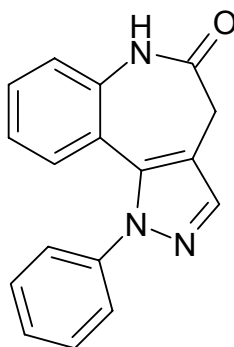


Nach AAV 3 (Methode A) aus 1 mmol (176 mg) 1*H*-[1]Benzazepin-2,5(3*H*,4*H*)-dion (**19**) und 1.5 mmol (271 mg) 4-Chlorphenyl-

hydrazin-Hydrochlorid (**29c**). Man erhält 250 mg (88%) eines hellgelben Pulvers.

Schmp.: > 380 °C (Lit.⁶⁵: > 330 °C); HPLC: t_s : 4.97 min; Reinheit: 99.7%/99.4% [ACN:H₂O (40:60); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m (DMSO): 1.03 min; 100%-Methode]

1-Phenyl-4,6-dihydropyrazolo[4,3-d][1]benzazepin-5(1H)-on (**8a**)

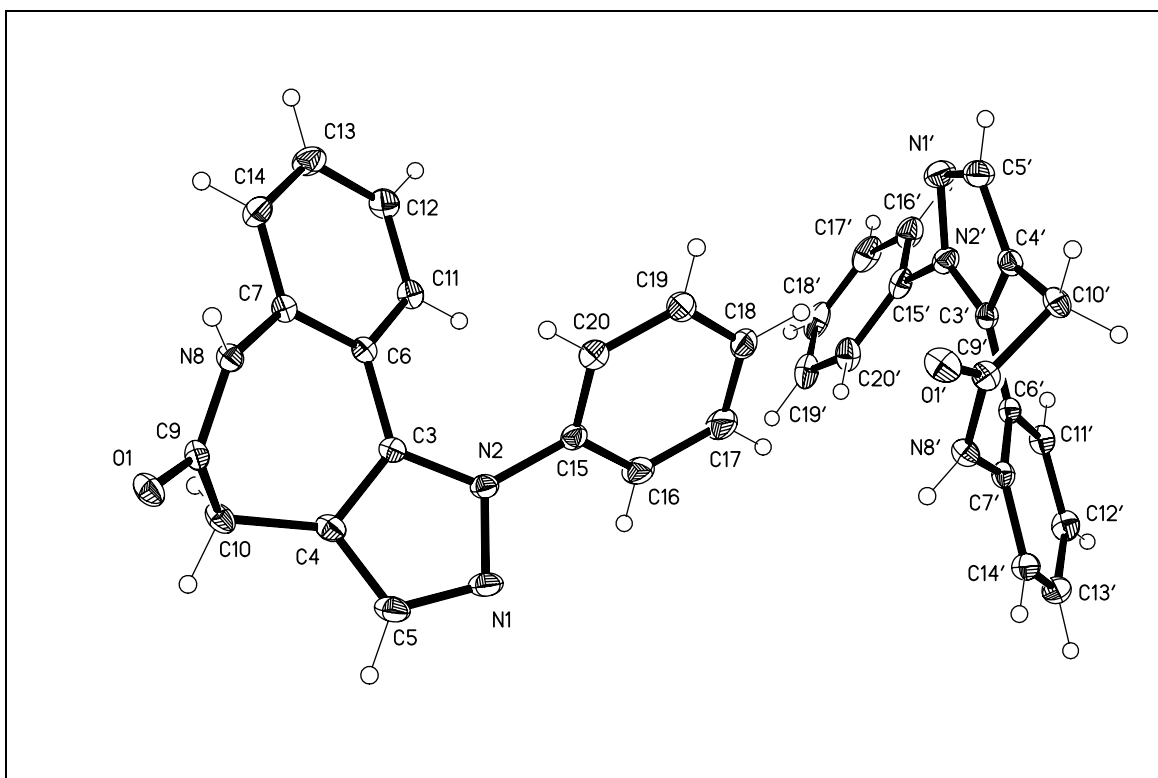


Nach AAV 1 aus 1 mmol (229 mg) 4-[(Dimethylamino)methylen]-3,4-dihydro-1H-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.5 mmol (150 μ l) Phenylhydrazin (**29a**). Umkristallisation aus Ethanol ergibt 152 mg (56%) hellgelbe Kristalle.

Schmp.: 247-248 °C; IR (KBr): 3055 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2967 cm⁻¹ und 2909 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1682 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) = 3.45 (s, 2H, CH₂), 6.95 (dd, 1H, J = 7.9/2.0 Hz, ArH), 6.99 („dt“, 1H, J = 6.9/7.9/1.0 Hz, ArH), 7.21 (dd, 1H, J = 7.9/0.8 Hz, ArH), 7.30-7.42 (m, 6H, ArH), 7.67 (s, 1H, ArH), 8.59 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100.6 MHz): δ (ppm) = 32.5

(CH₂); 123.2, 124.7, 125.3 (2C), 128.3, 129.60 (2C), 129.64, 129.66, 138.8 (tert. C); 118.0, 121.3, 135.5, 136.7, 140.3, 174.7 (quart. C); C₁₇H₁₃N₃O [275.31]: Ber. C: 74.17, H: 4.76, N: 15.26; Gef. C: 73.93, H: 4.77, N: 15.28; HPLC: t_s: 3.03 min; Reinheit: 99.5%/99.8% [ACN:H₂O (40:60); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m(DMSO): 1.03 min; 100%-Methode]; cLogP: 3.13 ± 0.53

Röntgenstruktur von Verbindung **8a**^a:



^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

Kristalldaten und Strukturverfeinerung:

Summenformel:	C ₁₇ H ₁₃ N ₃ O		
Mr:	275.31		
Temperatur:	133(2) K		
Wellenlänge:	0.71073 Å		
Kristallsystem:	Monoklin		
Raumgruppe:	P2 ₁ /n		
Gitterkonstanten:	a = 19.2027(15) Å	α = 90°	
	b = 7.5016(6) Å	β = 98.540(4)°	
	c = 19.3614(15) Å	γ = 90°	
Volumen:	2758.1(4) Å ³		
Z:	8		
Dichte (berechnet):	1.326 Mg/m ³		
Absorptionskoeffizient:	0.086 mm ⁻¹		
F(000)	1152		
Kristallgröße:	0.45 x 0.40 x 0.10 mm ³		
θ-Bereich für die Datensammlung: 1.39 bis 30.04°			
Zahl der Reflexe:	30572		
Unabhängige Reflexe:	8038 [R(int) = 0.0365]		
Vollständigkeit bis θ = 30.00°: 99.5%			
Absorptionskorrektur:	Keine		
Verfeinerungsmethode:	Full-matrix least-squares on F ²		
Daten/ Einschränkungen/ Parameter: 8038/ 0/ 387			
Goodness-of-fit on F ² :	1.027		
Final R indices [I>2σ(I)]: R1 = 0.0468, wR2 = 0.1093			
R indices (alle Daten): R1 = 0.0712, wR2 = 0.1185			
Größte Differenzpeaks: 0.307 and -0.259 e.Å ⁻³			

Tabelle 8-1: Bindungslängen [\AA]^{a, b}

O(1)-C(9)	1.2331(15)	O(1')-C(9')	1.2361(15)
N(1)-C(5)	1.3296(19)	N(1')-C(5')	1.3287(19)
N(1)-N(2)	1.3674(15)	N(1')-N(2')	1.3713(16)
N(2)-C(3)	1.3694(16)	N(2')-C(3')	1.3732(16)
N(2)-C(15)	1.4313(16)	N(2')-C(15')	1.4277(17)
C(3)-C(4)	1.3815(17)	C(3')-C(4')	1.3774(17)
C(3)-C(6)	1.4619(17)	C(3')-C(6')	1.4599(18)
C(4)-C(5)	1.3990(19)	C(4')-C(5')	1.3991(19)
C(4)-C(10)	1.4987(18)	C(4')-C(10')	1.4980(18)
C(6)-C(11)	1.4064(16)	C(6')-C(11')	1.4010(17)
C(6)-C(7)	1.4079(16)	C(6')-C(7')	1.4086(17)
C(7)-C(14)	1.3967(18)	C(7')-C(14')	1.3926(18)
C(7)-N(8)	1.4198(15)	C(7')-N(8')	1.4171(15)
N(8)-C(9)	1.3532(16)	N(8')-C(9')	1.3498(16)
C(9)-C(10)	1.5147(17)	C(9')-C(10')	1.5120(18)
C(11)-C(12)	1.3790(18)	C(11')-C(12')	1.3813(19)
C(12)-C(13)	1.392(2)	C(12')-C(13')	1.387(2)
C(13)-C(14)	1.3792(19)	C(13')-C(14')	1.3814(18)
C(15)-C(16)	1.3816(18)	C(15')-C(20')	1.386(2)
C(15)-C(20)	1.3861(19)	C(15')-C(16')	1.3882(19)
C(16)-C(17)	1.387(2)	C(16')-C(17')	1.387(2)
C(17)-C(18)	1.380(2)	C(17')-C(18')	1.374(3)

C(18)-C(19)	1.376(2)	C(18')-C(19')	1.381(2)
C(19)-C(20)	1.3906(19)	C(19')-C(20')	1.390(2)

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 8-2: Bindungswinkel [°]^{a, b}

C(5)-N(1)-N(2)	104.35(11)	C(11)-C(6)-C(3)	122.19(11)
N(1)-N(2)-C(3)	111.88(10)	C(7)-C(6)-C(3)	119.40(10)
N(1)-N(2)-C(15)	118.47(10)	C(14)-C(7)-C(6)	119.78(11)
C(3)-N(2)-C(15)	129.37(10)	C(14)-C(7)-N(8)	116.33(11)
N(2)-C(3)-C(4)	106.30(11)	C(6)-C(7)-N(8)	123.60(11)
N(2)-C(3)-C(6)	127.01(11)	C(9)-N(8)-C(7)	130.26(11)
C(4)-C(3)-C(6)	126.67(11)	O(1)-C(9)-N(8)	119.77(11)
C(3)-C(4)-C(5)	105.09(11)	O(1)-C(9)-C(10)	122.88(11)
C(3)-C(4)-C(10)	123.10(12)	N(8)-C(9)-C(10)	117.33(11)
C(5)-C(4)-C(10)	131.63(12)	C(4)-C(10)-C(9)	107.44(10)
N(1)-C(5)-C(4)	112.38(12)	C(12)-C(11)-C(6)	121.31(12)
C(11)-C(6)-C(7)	118.40(11)	C(11)-C(12)-C(13)	119.57(12)
C(14)-C(13)-C(12)	120.40(13)	C(11')-C(6')-C(3')	122.16(11)
C(13)-C(14)-C(7)	120.53(12)	C(7')-C(6')-C(3')	119.30(11)
C(16)-C(15)-C(20)	120.95(13)	C(14')-C(7')-C(6')	119.82(11)
C(16)-C(15)-N(2)	119.30(12)	C(14')-C(7')-N(8')	117.03(11)
C(20)-C(15)-N(2)	119.74(11)	C(6')-C(7')-N(8')	122.96(11)

C(15)-C(16)-C(17)	118.53(14)	C(9')-N(8')-C(7')	128.99(11)
C(18)-C(17)-C(16)	121.10(14)	O(1')-C(9')-N(8')	119.88(12)
C(19)-C(18)-C(17)	119.96(14)	O(1')-C(9')-C(10')	122.74(12)
C(18)-C(19)-C(20)	119.83(14)	N(8')-C(9')-C(10')	117.34(11)
C(15)-C(20)-C(19)	119.61(12)	C(4')-C(10')-C(9')	107.43(10)
C(5')-N(1')-N(2')	104.48(11)	C(12')-C(11')-C(6')	121.02(12)
N(1')-N(2')-C(3')	111.38(11)	C(11')-C(12')-C(13')	119.98(12)
N(1')-N(2')-C(15')	118.77(11)	C(14')-C(13')-C(12')	120.06(13)
C(3')-N(2')-C(15')	128.98(11)	C(13')-C(14')-C(7')	120.58(13)
N(2')-C(3')-C(4')	106.62(11)	C(20')-C(15')-C(16')	120.60(13)
N(2')-C(3')-C(6')	127.63(11)	C(20')-C(15')-N(2')	119.76(12)
C(4')-C(3')-C(6')	125.61(11)	C(16')-C(15')-N(2')	119.62(13)
C(3')-C(4')-C(5')	105.09(12)	C(17')-C(16')-C(15')	118.78(16)
C(3')-C(4')-C(10')	122.51(12)	C(18')-C(17')-C(16')	121.09(15)
C(5')-C(4')-C(10')	132.30(12)	C(17')-C(18')-C(19')	119.91(15)
N(1')-C(5')-C(4')	112.43(13)	C(18')-C(19')-C(20')	120.02(16)
C(11')-C(6')-C(7')	118.44(12)	C(15')-C(20')-C(19')	119.60(14)
O(1)-C(9)	1.2331(15)	O(1')-C(9')	1.2361(15)

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 8-3: Torsionswinkel [°]^{a, b}

C(5)-N(1)-N(2)-C(3)	0.06(15)	C(3)-N(2)-C(15)-C(16)	-136.69(14)
C(5)-N(1)-N(2)-C(15)	174.48(11)	N(1)-N(2)-C(15)-C(20)	-128.96(12)
N(1)-N(2)-C(3)-C(4)	-0.30(14)	C(3)-N(2)-C(15)-C(20)	44.34(18)
C(15)-N(2)-C(3)-C(4)	-173.95(12)	C(20)-C(15)-C(16)-C(17)	-0.1(2)
N(1)-N(2)-C(3)-C(6)	-178.94(11)	N(2)-C(15)-C(16)-C(17)	-179.09(13)
C(15)-N(2)-C(3)-C(6)	7.4(2)	C(15)-C(16)-C(17)-C(18)	-1.0(2)
N(2)-C(3)-C(4)-C(5)	0.40(14)	C(16)-C(17)-C(18)-C(19)	0.9(2)
C(6)-C(3)-C(4)-C(5)	179.04(12)	C(17)-C(18)-C(19)-C(20)	0.3(2)
N(2)-C(3)-C(4)-C(10)	176.15(11)	C(16)-C(15)-C(20)-C(19)	1.34(19)
C(6)-C(3)-C(4)-C(10)	-5.2(2)	N(2)-C(15)-C(20)-C(19)	-179.70(11)
N(2)-N(1)-C(5)-C(4)	0.21(16)	C(18)-C(19)-C(20)-C(15)	-1.43(19)
C(3)-C(4)-C(5)-N(1)	-0.39(16)	C(5')-N(1')-N(2')-C(3')	0.11(15)
C(10)-C(4)-C(5)-N(1)	-175.62(13)	C(5')-N(1')-N(2')-C(15')	170.36(12)
N(2)-C(3)-C(6)-C(11)	37.29(18)	N(1')-N(2')-C(3')-C(4')	-0.05(14)
C(4)-C(3)-C(6)-C(11)	-141.07(13)	C(15')-N(2')-C(3')-C(4')	-169.04(12)
N(2)-C(3)-C(6)-C(7)	-143.67(12)	N(1')-N(2')-C(3')-C(6')	-176.03(12)
C(4)-C(3)-C(6)-C(7)	37.97(18)	C(15')-N(2')-C(3')-C(6')	15.0(2)
C(11)-C(6)-C(7)-C(14)	-1.52(18)	N(2')-C(3')-C(4')-C(5')	-0.03(14)
C(3)-C(6)-C(7)-C(14)	179.41(11)	C(6')-C(3')-C(4')-C(5')	176.05(12)
C(11)-C(6)-C(7)-N(8)	-175.05(11)	N(2')-C(3')-C(4')-C(10')	176.71(11)
C(3)-C(6)-C(7)-N(8)	5.88(18)	C(6')-C(3')-C(4')-C(10')	-7.22(19)
C(14)-C(7)-N(8)-C(9)	142.32(13)	N(2')-N(1')-C(5')-C(4')	-0.13(16)

C(6)-C(7)-N(8)-C(9)	-43.94(19)	C(3')-C(4')-C(5')-N(1')	0.10(16)
C(7)-N(8)-C(9)-O(1)	177.50(12)	C(10')-C(4')-C(5')-N(1')	-176.17(13)
C(7)-N(8)-C(9)-C(10)	-1.20(19)	N(2')-C(3')-C(6')-C(11')	40.21(19)
C(3)-C(4)-C(10)-C(9)	-61.58(16)	C(4')-C(3')-C(6')-C(11')	-135.05(13)
C(5)-C(4)-C(10)-C(9)	112.92(16)	N(2')-C(3')-C(6')-C(7')	-143.63(13)
O(1)-C(9)-C(10)-C(4)	-113.57(13)	C(4')-C(3')-C(6')-C(7')	41.12(18)
N(8)-C(9)-C(10)-C(4)	65.10(15)	C(11')-C(6')-C(7')-C(14')	-3.31(18)
C(7)-C(6)-C(11)-C(12)	1.59(18)	C(3')-C(6')-C(7')-C(14')	-179.62(11)
C(3)-C(6)-C(11)-C(12)	-179.37(12)	C(11')-C(6')-C(7')-N(8')	-178.19(11)
C(6)-C(11)-C(12)-C(13)	-0.4(2)	C(3')-C(6')-C(7')-N(8')	5.50(18)
C(11)-C(12)-C(13)-C(14)	-0.8(2)	C(14')-C(7')-N(8')-C(9')	137.40(14)
C(12)-C(13)-C(14)-C(7)	0.8(2)	C(6')-C(7')-N(8')-C(9')	-47.58(19)
C(6)-C(7)-C(14)-C(13)	0.3(2)	C(7')-N(8')-C(9')-O(1')	-179.82(12)
N(8)-C(7)-C(14)-C(13)	174.33(12)	C(7')-N(8')-C(9')-C(10')	2.50(19)
N(1)-N(2)-C(15)-C(16)	50.02(17)	C(3')-C(4')-C(10')-C(9')	-61.91(15)
C(5')-C(4')-C(10')-C(9')	113.83(16)	C(3')-N(2')-C(15')-C(20')	38.98(19)
O(1')-C(9')-C(10')-C(4')	-112.92(14)	N(1')-N(2')-C(15')-C(16')	48.79(17)
N(8')-C(9')-C(10')-C(4')	64.69(15)	C(3')-N(2')-C(15')-C(16')	-142.92(14)
C(7')-C(6')-C(11')-C(12')	1.32(19)	C(20')-C(15')-C(16')-C(17')	0.0(2)
C(3')-C(6')-C(11')-C(12')	177.52(12)	N(2')-C(15')-C(16')-C(17')	-178.07(13)
C(6')-C(11')-C(12')-C(13')	1.7(2)	C(15')-C(16')-C(17')-C(18')	0.4(2)
C(11')-C(12')-C(13')-C(14')	-2.7(2)	C(16')-C(17')-C(18')-C(19')	-0.7(2)
C(12')-C(13')-C(14')-C(7')	0.6(2)	C(17')-C(18')-C(19')-C(20')	0.6(2)
C(6')-C(7')-C(14')-C(13')	2.38(19)	C(16')-C(15')-C(20')-C(19')	-0.1(2)

N(8')-C(7')-C(14')-C(13')	177.56(12)	N(2')-C(15')-C(20')-C(19')	178.01(13)
N(1')-N(2')-C(15')-C(20')	-129.31(14)	C(18')-C(19')-C(20')-C(15')	-0.2(2)

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 8-4: Wasserstoffbrückenbindungen: Bindungslängen [Å] und Winkel [°]^{a, b}

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	W(DHA)
N(8)-H(01)...O(1)#1	0.935(17)	1.880(18)	2.7876(14)	162.7(15)
N(8')-H(01')...O(1')#2	0.862(17)	1.947(18)	2.7933(15)	167.0(16)
C(19)-H(19)...N(1)#3	0.95	2.68	3.5722(19)	156.0
C(10')-H(10C)...O(1')#4	0.99	2.52	3.4289(17)	153.0

Symmetrietransformationen für die Generierung äquivalenter Atome:

#1 -x-1/2,y-1/2,-z+1/2

#2 -x+1/2,y+1/2,-z+1/2

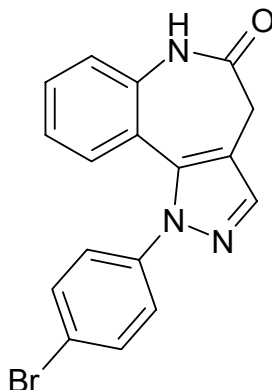
#3 x,y-1,z

#4 -x+1/2,y-1/2,-z+1/2

^a Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

^b Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

1-(4-Bromphenyl)-4,6-dihydropyrazolo[4,3-d][1]benzazepin-5(1H)-on
(8b)

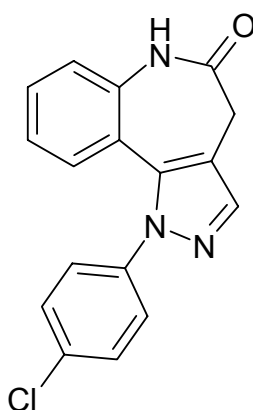


Nach AAV 1 aus 1 mmol (236 mg) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.5 mmol (344 mg) 4-Bromphenylhydrazin-Hydrochlorid (**29b**). Umkristallisation aus Ethanol ergibt 270 mg (74%) feiner gelber Nadeln.

Schmp.: 282 °C; IR (KBr): 3226 cm⁻¹ (NH), 3123 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2956 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1668 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.32 (s, 2H, CH₂), 6.88 (dd, 1H, *J* = 7.9/1.4 Hz, ArH), 7.03 („dt“, 1H, *J* = 8.4/8.0/1.2 Hz, ArH), 7.25-7.30 (m, 3H, ArH), 7.36 („dt“, 1H, *J* = 7.3/8.3/1.5 Hz, ArH), 7.64-7.67 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.80 (s, 1H, ArH), 10.14 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.9 (CH₂); 123.1, 123.5, 126.6 (2C), 128.4, 129.1, 132.2 (2C), 138.9 (tert. C); 118.3, 119.6, 120.5, 136.0, 136.1, 138.7, 172.6 (quart. C); C₁₇H₁₂BrN₃O [354.22]: Ber. C: 57.65, H: 3.41, N: 11.86; Gef. C: 57.48, H: 3.33, N: 11.59; HPLC: t_s: 2.97 min; Reinheit: 99.6%/99.6% [ACN:H₂O (50:50); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min;

254/280 nm; t_m (DMSO): 1.02 min; 100%-Methode]; cLogP: 3.90 ± 0.58

1-(4-Chlorphenyl)-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-on
(8c)

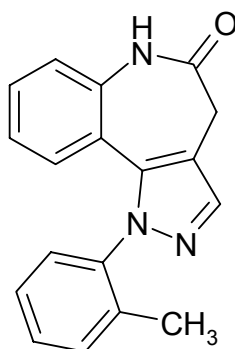


Nach AAV 1 aus 1 mmol (231 mg) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.5 mmol (271 mg) 4-Chlorphenylhydrazin-Hydrochlorid (**29c**). Umkristallisation aus Ethanol ergibt 240 mg (73%) feiner farbloser Kristalle.

Schmp.: 273-274 °C; IR (KBr): 3178 cm^{-1} (NH), 3062 cm^{-1} (CH aromatisch), 2977 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1691 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.32 (s, 2H, CH_2), 6.87 (dd, 1H, $J = 7.9/1.4$ Hz, ArH), 7.03 („dt“, 1H, $J = 7.0/8.0/1.3$ Hz, ArH), 7.28 (dd, 1H, $J = 8.2/1.0$ Hz, ArH), 7.33-7.37 (m, 3H, ArH), 7.51-7.54 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.80 (s, 1H, ArH), 10.13 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.9 (CH_2); 123.0, 123.5, 126.3 (2C), 128.4, 129.1, 129.3 (2C), 138.5 (tert. C);

118.2, 119.6, 132.1, 136.0, 138.6, 172.6 (quart. C, ein C nicht detektiert bei 960 Scans); C₁₇H₁₂ClN₃O [309.77]: Ber. C: 65.92, H: 3.90, N: 13.57; Gef. C: 65.81, H: 3.80, N: 13.35; HPLC: t_s: 2.60 min; Reinheit: 99.6%/99.7% [ACN:H₂O (50:50); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m(DMSO): 1.02 min; 100%-Methode]; cLogP: 3.73 ± 0.54

1-(2-Methylphenyl)-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-on (8d)

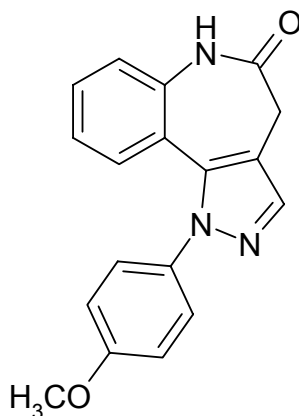


Nach AAV 1 aus 1 mmol (231 mg) 4-[(Dimethylamino)methylen]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.5 mmol (241 mg) 2-Methylphenylhydrazin-Hydrochlorid. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 212 mg (73%) farblose Kristalle.

Schmp.: 245 °C; IR (KBr): 3202 cm⁻¹ (NH), 3065 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2980 und 2920 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1689 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.81 (s, 3H, CH₃), 3.35 (s, 2H, CH₂), 6.71 (dd, 1H, *J* = 7.9/1.3 Hz, ArH), 6.89 („dt“, 1H, *J* = 6.9/8.0/1.4 Hz, ArH), 7.23-7.36 (m, 5H, ArH), 7.40 („dt“, 1H,

$J = 7.5/7.1/1.5$ Hz, ArH), 7.76 (s, 1H, ArH), 10.07 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 16.8 (CH_3); 31.9 (CH_2); 122.7, 123.3, 126.9, 127.1, 127.7, 128.8, 129.1, 131.0, 137.7 (tert. C); 115.9, 119.7, 134.6, 135.9, 137.3, 139.0, 172.7 (quart. C); $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$ [289.36]: Ber. C: 74.72, H: 5.23, N: 14.52; Gef. C: 74.39, H: 5.26, N: 14.12; HPLC: t_s : 3.72 min; Reinheit: 99.4%/99.6% [ACN:H₂O (40:60); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m (DMSO): 1.03 min; 100%-Methode]; cLogP: 3.59 ± 0.53

1-(4-Methoxyphenyl)-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-on (**8e**)

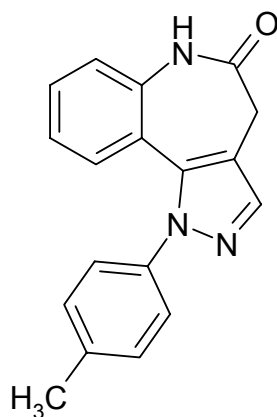


Nach AAV 1 aus 1 mmol (232 mg) 4-[(Dimethylamino)methylen]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.5 mmol (265 mg) 4-Methoxyphenylhydrazin-Hydrochlorid (**29e**). Umkristallisation aus Ethanol ergibt 274 mg (89%) feine hellgelbe Kristalle.

Schmp.: 275 °C; IR (KBr): 3224 cm^{-1} (NH), 3128 cm^{-1} (CH aromatisch), 1669 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz):

δ (ppm) = 3.31 (s, 2H, CH₂), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 6.84 (dd, 1H, J = 7.9/1.3 Hz, ArH), 6.96-7.02 (m, 3H, ArH), 7.20-7.27 (m, 3H, ArH), 7.32 („dt“, 1H, J = 7.5/7.7/1.5 Hz, ArH), 7.71 (s, 1H, ArH), 10.07 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.9 (CH₂); 55.4 (CH₃); 114.3 (2C), 122.9, 123.3, 126.3 (2C), 128.2, 128.7, 137.6 (tert. C); 117.2, 119.9, 132.8, 136.0, 158.6, 172.6 (quart. C, ein C nicht detektiert bei 960 Scans); C₁₈H₁₅N₃O₂ [305.36]: Ber. C: 70.81, H: 4.95, N: 13.76; Gef. C: 70.46, H: 4.96, N: 13.31; HPLC: t_s : 3.13 min; Reinheit: 99.4%/99.6% [ACN:H₂O (40:60); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m (DMSO): 1.03 min; 100%-Methode]; cLogP: 3.05 \pm 0.88

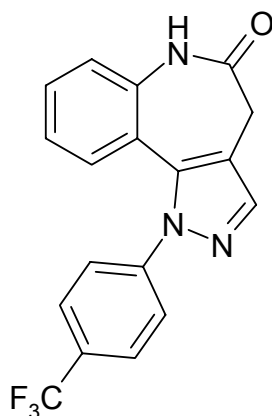
1-(4-Methylphenyl)-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-on (8f)



Nach AAV 1 aus 1 mmol (230 mg) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.5 mmol (237 mg) 4-Methylphenylhydrazin-Hydrochlorid (**29f**). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 245 mg (85%) eines weißen Pulvers.

Schmp.: 285-287 °C; IR (KBr): 3177 cm⁻¹ (NH), 3062 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2976 cm⁻¹ und 2924 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1692 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.35 (s, 3H, CH₃), 3.31 (s, 2H, CH₂), 6.84 (dd, 1H, *J* = 7.9/1.3 Hz, ArH), 6.98 („dt“, 1H, *J* = 8.1/8.3/1.3 Hz, ArH), 7.17-7.19 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.25-7.28 (m, 3H, ArH), 7.33 („dt“, 1H, *J* = 8.1/8.3/1.5 Hz, ArH), 7.74 (s, 1H, ArH), 10.10 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 20.6 (CH₃); 31.9 (CH₂); 123.0, 123.3, 124.6 (2C), 128.3, 128.8, 129.7 (2C), 137.3 (tert. C); 117.6, 120.0, 135.88, 135.94, 137.3, 172.7 (quart. C, ein C nicht detektiert bei 960 Scans); C₁₈H₁₅N₃O [289.36]: Ber. C: 74.72, H: 5.23, N: 14.52; Gef. C: 74.50, H: 5.22, N: 14.31; HPLC: t_s: 5.32 min; Reinheit: 99.8%/99.9% [ACN:H₂O (40:60); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m(DMSO): 1.03 min; 100%-Methode]; cLogP: 3.59 ± 0.53

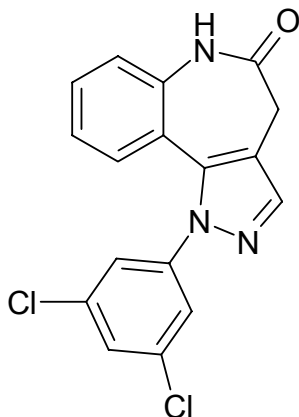
1-(4-Trifluormethylphenyl)-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-on (8g)



Nach AAV 1 aus 1 mmol (230 mg) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.5 mmol (318 mg) 4-Trifluormethylphenylhydrazin-Hydrochlorid (**29g**). Umkristallisation aus Ethanol ergibt 257 mg (75%) eines weißen Pulvers.

Schmp.: 245 °C; IR (KBr): 3172 cm⁻¹ (NH), 3065 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2979 cm⁻¹ und 2927 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1692 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.34 (CH₂ vom Wasserpeak überdeckt!), 6.89 (dd, 1H, *J* = 7.9/1.4 Hz, ArH), 7.04 („dt“, 1H, *J* = 8.0/8.4/1.3 Hz, ArH), 7.31 (dd, 1H, *J* = 8.2/1.0 Hz, ArH), 7.39 („dt“, 1H, *J* = 8.3/8.5/1.5 Hz, ArH), 7.53-7.56 (m, Teil eines AA'XX'-System, 2H, ArH), 7.83-7.85 (m, Teil eines AA'XX'-System, 2H, ArH), 7.87 (s, 1H, ArH), 10.18 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.9 (CH₂); 123.1, 123.6, 124.9 (2C), 126.5, 128.5 (2C), 129.3, 139.3 (tert. C); 119.0, 119.5, 125.3, 136.0, 136.3, 142.7, 172.7 (quart. C, ein C nicht detektiert bei 960 Scans); C₁₈H₁₂F₃N₃O [343.33]: Ber. C: 62.97, H: 3.52, N: 12.24; Gef. C: 62.57, H: 3.43, N: 12.10; HPLC: *t*_s: 3.53 min; Reinheit: 99.0%/99.5% [ACN:H₂O (50:50); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min, 254/280 nm; *t*_m(DMSO): 1.02 min; 100%-Methode]; cLogP: 3.70 ± 0.90

1-(3,5-Dichlorphenyl)-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-on (**8h**)

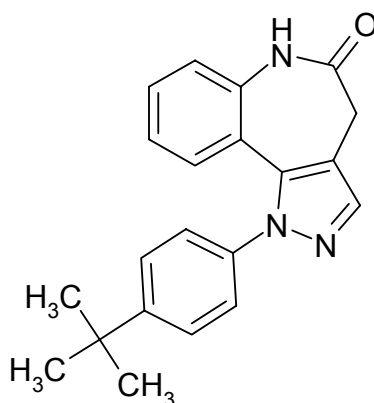


Nach AAV 1 aus 1 mmol (230 mg) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.5 mmol (320 mg) 3,5-Dichlorphenylhydrazin-Hydrochlorid (**29h**). Umkristallisation aus Ethanol ergibt 274 mg (80%) hellgelbe Kristalle.

Schmp.: 283-284 °C; IR (KBr): 3215 cm⁻¹ (NH), 3144 cm⁻¹ und 3098 cm⁻¹ (CH aromatisch), 1690 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.34 (CH₂ vom Wasserpeak überdeckt!), 6.96 (dd, 1H, *J* = 7.9/1.4 Hz, ArH), 7.08 („dt“, 1H, *J* = 8.0/8.4/1.2 Hz, ArH), 7.31 (dd, 1H, *J* = 8.2/1.0 Hz, ArH), 7.38 („d“, 2H, *J* = 1.9 Hz, ArH), 7.41 („dt“, 1H, *J* = 8.3/8.5/1.5 Hz, ArH), 7.68 („t“, 1H, *J* = 1.9 Hz, ArH), 7.85 (s, 1H, ArH), 10.15 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.8 (CH₂); 123.1 (nur im DEPT), 123.2 (2C), 123.4, 127.3, 128.5, 129.4, 139.3 (tert. C); 118.8, 119.2, 134.3 (2C), 136.1, 136.4, 141.3, 172.4 (quart. C), C₁₇H₁₁Cl₂N₃O [344.21]: Ber. C: 59.32, H: 3.22, N: 12.21; Gef. C: 59.00, H: 3.17, N: 11.96; HPLC: t_s: 5.73 min; Reinheit: 99.6%/99.8% [ACN:H₂O (50:50); 15 min;

Flussrate: 1.000 ml/min, 254/280 nm; t_m (DMSO): 1.02 min; 100%-Methode]; cLogP: 4.33 ± 0.56

1-(4-*tert*-Butylphenyl)-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5-(1*H*)-on (**8i**)

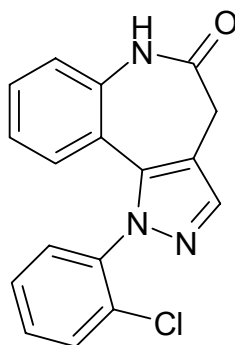


Nach AAV 1 aus 1 mmol (231 mg) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.5 mmol (305 mg) 4-*tert*-Butylphenylhydrazin-Hydrochlorid (**29i**). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 138 mg (42%) farblose Kristalle.

Schmp.: 228-229 °C; IR (KBr): 3204 cm^{-1} (NH), 3134 cm^{-1} und 3099 cm^{-1} (CH aromatisch), 2963 cm^{-1} , 2914 cm^{-1} und 2870 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1690 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.30 (s, 9H, CH_3), 3.31 (s, 2H, CH_2), 6.85 (dd, 1H, $J = 7.9/1.3$ Hz, ArH), 6.96 („dt“, 1H, $J = 8.1/8.3/1.4$ Hz, ArH), 7.21-7.24 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.45-7.48 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.27 (dd, 1H, $J = 8.1/1.2$ Hz, ArH), 7.33 („dt“, 1H, $J = 8.3/8.4/1.5$ Hz, ArH), 7.75 (s, 1H, ArH), 10.10 (s, 1H,

NH); ^{13}C -NMR ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.0 (3xCH₃); 31.9 (CH₂); 123.0, 123.3, 124.3 (2C), 125.9 (2C), 128.3, 128.8, 138.0 (tert. C); 34.4, 117.7, 120.0, 135.90, 135.92, 137.3, 150.3, 172.7 (quart. C); C₂₁H₂₁N₃O [331.45]: Ber. C: 76.11, H: 6.39, N: 12.68; Gef. C: 75.99, H: 6.39, N: 12.49; HPLC: t_s : 6.87 min; Reinheit: 99.5%/99.7% [ACN:H₂O (50:50); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; $t_m(\text{DMSO})$: 1.02 min; 100%-Methode]; cLogP: 4.82 \pm 0.54

1-(2-Chlorphenyl)-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-on
(**8j**)

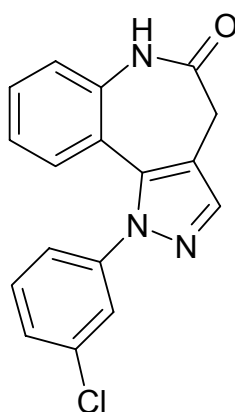


Nach AAV 1 aus 1 mmol (231 mg) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.5 mmol (269 mg) 2-Chlorphenylhydrazin-Hydrochlorid (**29j**). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 201 mg (65%) orangefarbene Kristalle.

Schmp.: 244-245 °C; IR (KBr): 3286 cm⁻¹ (NH), 1687 cm⁻¹ (C=O); ^1H -NMR ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 400 MHz): δ (ppm) = 3.38 (s (breit), 2H, CH₂), 6.74 (dd, 1H, J = 7.9/1.3 Hz, ArH), 6.93 („dt“, 1H, J = 8.1/8.3/1.4 Hz,

ArH), 7.24 (dd, 1H, $J = 8.2/1.1$ Hz, ArH), 7.31 („dt“, 1H, $J = 8.3/8.4/1.5$ Hz, ArH), 7.50-7.63 (m, 4H, ArH), 7.80 (s, 1H, ArH), 10.08 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.8 (CH_2); 122.8, 123.4, 126.5, 128.4, 129.0, 130.0, 130.3, 130.9, 138.5 (tert. C); 116.1, 119.6, 130.5, 136.0, 137.4, 138.0, 172.5 (quart. C); $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{O}$ [309.77]: Ber. C: 65.92, H: 3.90, N: 13.57; Gef. C: 65.63, H: 3.93, N: 13.36; HPLC: t_s : 3.36 min; Reinheit: 99.8%/99.4% [ACN:H₂O (40:60); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; $t_m(\text{DMSO})$: 1.03 min; 100%-Methode]; cLogP: 4.08 ± 0.55

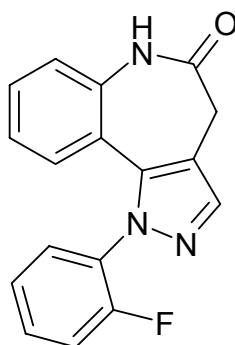
1-(3-Chlorphenyl)-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-on
(**8k**)



Nach AAV 1 aus 1 mmol (230 mg) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.5 mmol (268 mg) 3-Chlorphenylhydrazin-Hydrochlorid (**29k**). Umkristallisation aus Ethanol ergibt 252 mg (82%) hellgelbe Kristalle.

Schmp.: 272-273 °C; IR (KBr): 3220 cm⁻¹ (NH), 3144 cm⁻¹ (CH aromatisch), 1684 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.33 (s, CH₂ wird vom Wasserpeak überdeckt!), 6.89 (dd, 1H, *J* = 7.9/1.4 Hz, ArH), 7.03 („dt“, 1H, *J* = 8.0/8.4/1.3 Hz, ArH), 7.22 („dt“, 1H, *J* = 7.1/2.0/2.2 Hz, ArH), 7.29 (dd, 1H, *J* = 8.2/1.0 Hz, ArH), 7.38 („dt“, 1H, *J* = 8.3/8.5/1.5 Hz, ArH), 7.43-7.51 (m, 3H, ArH), 7.81 (s, 1H, ArH), 10.13 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.9 (CH₂); 123.1, 123.3, 123.4, 124.4, 127.7, 128.4, 129.2, 130.8, 138.8 (tert. C); 118.4, 119.5, 133.4, 136.0, 136.2, 140.8, 172.6 (quart. C); C₁₇H₁₂ClN₃O [309.77]: Ber. C: 65.92, H: 3.90, N: 13.57; Gef. C: 65.60, H: 3.88, N: 13.29; HPLC: t_s: 2.66 min; Reinheit: 99.7%/99.5% [ACN:H₂O (50:50); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m(DMSO): 1.02 min; 100%-Methode]; cLogP: 3.73 ± 0.54

1-(2-Fluorphenyl)-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-on
(8I)

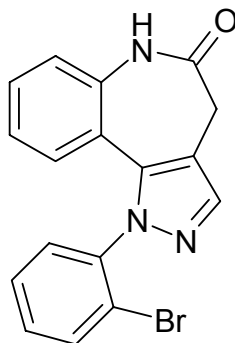


Nach AAV 1 aus 1 mmol (230 mg) 4-[(Dimethylamino)methylen]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.5 mmol (245 mg)

2-Fluorphenylhydrazin-Hydrochlorid (**29I**). Nach Umkristallisation erhält man 182 mg (62%) gelbe Kristalle.

Schmp.: 234-236 °C; IR (KBr): 3210 cm⁻¹ (NH), 3140 cm⁻¹ und 3100 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2972 cm⁻¹ und 2916 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1685 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.36 (s, 2H, CH₂), 6.82 (dd, 1H, *J* = 7.8/1.3 Hz, ArH), 6.96 („dt“, 1H, *J* = 8.0/8.3/1.3 Hz, ArH), 7.26 (dd, 1H, *J* = 8.1/1.1 Hz, ArH), 7.31-7.41 (m, 3H, ArH), 7.52-7.58 (m, 1H, ArH), 7.62 (t, 1H, *J* = 7.3/7.6 Hz, ArH), 7.83 (s, 1H, ArH), 10.12 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.8 (CH₂); 116.7 (d, ²*J*_{C,F} = 19.6 Hz), 122.9, 123.4, 125.4 (d, ⁴*J*_{C,F} = 3.6 Hz), 126.4, 128.9, 129.0, 130.9 (d, ³*J*_{C,F} = 8.1 Hz), 138.8 (tert. C); 119.6, 127.6, 127.7, 135.9, 137.9, 155.6 (d, ¹*J*_{C,F} = 155.6 Hz), 172.4 (quart. C); C₁₇H₁₂FN₃O [293.30]: Ber. C: 69.62, H: 4.12, N: 14.33; Gef. C: 69.37, H: 4.09, N: 13.97; HPLC: t_s: 2.75 min; Reinheit: 98.2%/97.8% [ACN:H₂O (40:60); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m(DMSO): 1.03 min; 100%-Methode]; cLogP: 3.53 ± 0.58

1-(2-Bromphenyl)-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-on
(8m)

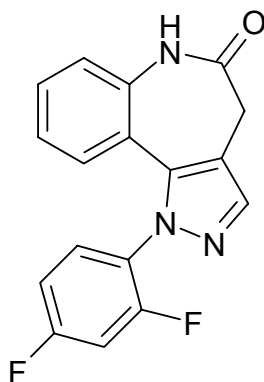


Nach AAV 1 aus 1 mmol (236 mg) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.5 mmol (256 mg) 2-Bromphenylhydrazin-Hydrochlorid (**29m**). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 206 mg (57%) orangefarbene Kristalle.

Schmp.: 248-249 °C; IR (KBr): 3281 cm⁻¹ (NH), 3158 cm⁻¹ und 3062 cm⁻¹ (CH aromatisch), 1686 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.37 (s (breit), 2H, CH₂), 6.74 (dd, 1H, *J* = 7.8/1.5 Hz, ArH), 6.92 („dt“, 1H, *J* = 8.1/8.3/1.4 Hz, ArH), 7.24 (dd, 1H, *J* = 8.1/1.3 Hz, ArH), 7.30 („dt“, 1H, *J* = 8.3/8.6/1.5 Hz, ArH), 7.47 (ddd, 1H, *J* = 7.8/7.8/2.3 Hz, ArH), 7.53-7.59 (m, 2H, ArH), 7.77-7.78 (m, 2H, ArH), 10.07 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.8 (CH₂); 122.8, 123.3, 126.7, 128.9 (2C), 130.2, 131.2, 133.4, 138.3 (tert. C); 116.0, 119.5, 121.1, 136.0, 137.7, 139.0, 172.5 (quart. C); C₁₇H₁₂BrN₃O [354.22]: Ber. C: 57.65, H: 3.41, N: 11.86; Gef. C: 57.41, H: 3.39, N: 11.92; HPLC: t_s: 3.56 min; Reinheit: 99.7%/99.3% [ACN:H₂O (40:60); 15 min; Flussrate: 1.000

ml/min; 254/280 nm; t_m (DMSO): 1.03 min; 100%-Methode]; cLogP: 4.25 \pm 0.58

1-(2,4-Difluorphenyl)-4,6-dihydropyrazolo[4,3-d][1]benzazepin-5-
(1*H*)-on (**8n**)

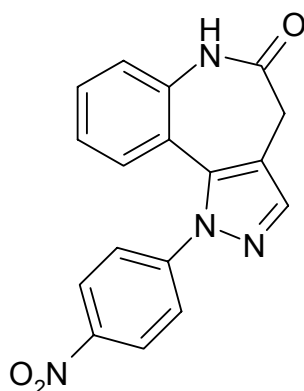


Nach AAV 1 aus 1 mmol (230 mg) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.5 mmol (271 mg) 2,4-Difluorphenylhydrazin-Hydrochlorid (**29n**). Umkristallisation aus Ethanol ergibt 193 mg (62%) farblose Kristalle.

Schmp.: 217-218 °C; Aussehen: IR (KBr): 3233 cm^{-1} (NH), 3126 cm^{-1} und 3088 cm^{-1} (CH aromatisch), 2981 cm^{-1} und 2896 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1673 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.33 (s, CH_2 vom Wasserpeak überdeckt!), 6.85 (dd, 1H, $J = 7.8/1.3$ Hz, ArH), 7.00 („dt“, 1H, $J = 8.1/8.3/1.3$ Hz, ArH), 7.26-7.37 (m, 3H, ArH), 7.47 („dt“, 1H, $J = 10.9/10.9/2.8$ Hz, ArH), 7.71 („q“, 1H, $J = 8.6/6.3/8.3$ Hz, ArH), 7.83 (s, 1H, ArH), 10.12 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.8 (CH_2); 105.3 („t“, $^2J_{\text{C},\text{F}} = 24.0/27.4$ Hz), 112.6 („d“, $^2J_{\text{C},\text{F}} = 26.6$ Hz) , 122.9, 123.5,

126.5, 129.1, 130.3 („t“, $^3J_{C,F} = 10.6$ Hz), 139.0 (tert. C); 116.6, 119.4, 124.5, 136.0, 138.0, 172.4 (quart. C, zwei C nicht detektiert bei 960 Scans); $C_{17}H_{11}F_2N_3O$ [311.31]: Ber. C: 65.59, H: 3.56, N: 13.50; Gef. C: 64.62, H: 3.44, N: 13.47; HPLC: t_s : 3.52 min; Reinheit: 99.6%/99.2% [ACN:H₂O (40:60); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m (DMSO): 1.03 min; 100%-Methode]; cLogP: 3.62 ± 0.60

1-(4-Nitrophenyl)-4,6-dihydropyrazolo[4,3-d][1]benzazepin-5(1H)-on
(8o)

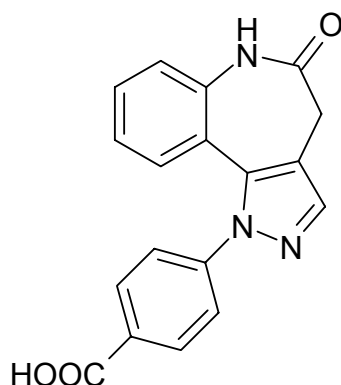


Nach AAV 1 aus 1 mmol (233 mg) 4-[(Dimethylamino)methylen]-3,4-dihydro-1H-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.5 mmol (232 mg) 4-Nitrophenylhydrazin-Hydrochlorid (**29o**). Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 214 mg (66%) farblose Kristalle.

Schmp.: 264 °C; IR (KBr): 3196 cm^{-1} (NH), 3067 cm^{-1} (CH aromatisch), 2954 und 2898 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1681 cm^{-1} (C=O); 1H -NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.33 (s, CH₂ vom Wasserpeak überdeckt!), 6.94 (dd, 1H, $J = 8.0/1.4$ Hz, ArH), 7.05

(„dt“, 1H, $J = 8.1/8.3/1.3$ Hz, ArH), 7.32 (dd, 1H, $J = 8.1/0.9$ Hz, ArH), 7.41 („dt“, 1H, $J = 8.3/8.6/1.5$ Hz, ArH), 7.57-7.61 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.91 (s, 1H, ArH), 8.30-8.33 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 10.21 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.9 (CH₂); 123.2, 123.6, 124.79 (2C), 124.82 (2C), 128.7, 129.4, 139.9 (tert. C); 119.4, 119.6, 136.1, 136.5, 144.4, 145.8, 172.6 (quart. C); C₁₇H₁₂N₄O₃ [320.33]: Ber. C: 63.75, H: 3.78, N: 17.49; Gef. C: 63.62, H: 3.77, N: 17.38; HPLC: t_s : 4.44 min; Reinheit: 99.7%/99.6% [ACN:H₂O (40:60); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m (DMSO): 1.03 min; 100%-Methode]; cLogP: 3.27 ± 1.02

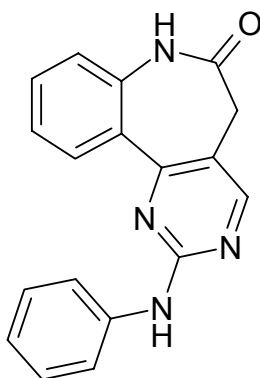
4-(5-oxo-5,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-1(4*H*)-yl)-benzoesäure (**8p**)



Nach AAV 1 aus 1 mmol (232 mg) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.5 mmol (233 mg) 4-Hydrazinobenzoessäure (**29p**). Nach Umkristallisation aus Ethanol/Toluol erhält man 179 mg (56%) farblose Kristalle.

Schmp.: 338 °C; IR (KBr): 3179 cm⁻¹ (NH), 3053 cm⁻¹ (OH (breit), Carbonsäure), 1717 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.33 (CH₂ vom Wasserpeak überdeckt!), 6.87 („d“, 1H, *J* = 7.8 Hz, ArH), 7.02 („t“, 1H, *J* = 7.6 Hz, ArH), 7.31 („d“, 1H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 7.30 („t“, 1H, *J* = 7.8 Hz, ArH), 7.42-7.44 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.84 (s, 1H, ArH), 7.99-8.01 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 10.16 (s, 1H, NH), 13.15 (s, 1H, COOH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.9 (CH₂); 123.1, 123.5, 124.3 (2C), 128.5, 129.2, 130.4 (2C), 139.0 (tert. C); 118.8, 119.7, 129.2, 136.0, 136.2, 142.9, 166.5, 172.7 (quart. C); C₁₈H₁₃N₃O₃ [319.32]: Ber. C: 67.71, H: 4.10, N: 13.16; Gef. C: 67.53, H: 4.05, N: 13.03; HPLC: t_s: 2.61 min; Reinheit: 100.0%/99.8% [ACN:H₂O (30:70); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m(DMSO): 1.03 min; 100%-Methode]; cLogP: 2.81 ± 0.88

2-Anilino-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-on (**9a**)

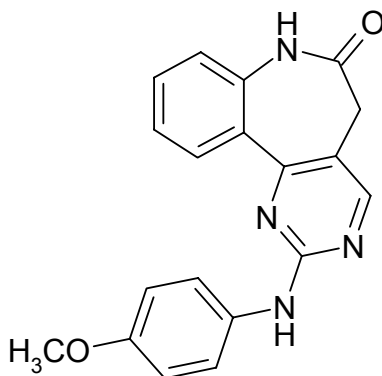


Nach AAV 4 (Methode A) aus 1 mmol (232 mg) 4-[(Dimethylamino)-methylen]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.2

mmol (228 mg) Phenylguanidiniumnitrat (**43a**). Reaktionsdauer: 6 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 182 mg (60%) farblose Kristalle.

Schmp.: 286-287 °C; IR (KBr): 3255 cm⁻¹ und 3194 cm⁻¹ (NH), 3066 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2970 cm⁻¹ und 2910 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1673 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.38 (s, 2H, CH₂), 6.95 („dt“, 1H, *J* = 7.3/7.3/1.0 Hz, ArH), 7.03 (dd, 1H, *J* = 8.2/1.0 Hz, ArH), 7.28-7.37 (m, 3H, ArH), 7.56 („dt“, 1H, *J* = 8.1/8.3/1.5 Hz, ArH), 7.82-7.84 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 8.08 (dd, 1H, *J* = 7.8/1.5 Hz, ArH), 8.51 (s, 1H, ArH), 9.73 (s, 1H, NH), 10.25 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 36.2 (CH₂); 118.7 (2C), 121.3, 122.1, 123.9, 128.5 (2C), 129.8, 131.2, 157.4 (tert. C); 117.4, 128.7, 138.1, 140.6, 159.4, 160.6, 171.6 (quart. C); C₁₈H₁₄N₄O [302.33]: Ber. C: 71.51, H: 4.67, N: 18.53; Gef. C: 71.19, H: 4.64, N: 18.50; HPLC: t_s: 3.18 min; Reinheit: 99.9%/99.9% [ACN:H₂O (40:60); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m(DMSO): 1.03 min; 100%-Methode]; cLogP: 2.94 ± 0.47

2-(4-Methoxyanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-on (9b)

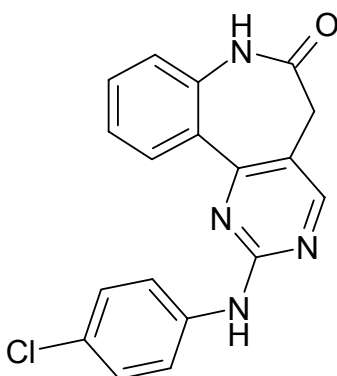


Nach AAV 4 (Methode A) aus 1 mmol (235 mg) 4-[(Dimethylamino)-methyliden]-3,4-dihydro-1H-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.2 mmol (292 mg) 4-Methoxyphenylguanidiniumnitrat (**43b**). Reaktionsdauer: 9 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 217 mg (64%) hellgrüne Kristalle.

Schmp.: 262-263 °C; IR (KBr): 3271 cm⁻¹ und 3195 cm⁻¹ (NH), 3064 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2956 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1681 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.35 (s, 2H, CH₂), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 6.87-6.91 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.23 (dd, 1H, J = 8.1/0.8 Hz, ArH), 7.33 ("dt", 1H, J = 8.3/7.9/1.1 Hz, ArH), 7.55 ("dt", 1H, J = 8.1/7.7/1.6 Hz, ArH), 7.68-7.72 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 8.05 (dd, 1H, J = 7.9/1.5 Hz, ArH), 8.45 (s, 1H, ArH), 9.53 (s, 1H, NH), 10.22 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.1 (OCH₃); 36.2 (CH₂); 113.7 (2C), 120.5 (2C), 122.0, 123.9, 129.8, 131.1, 157.4 (tert. C); 116.9, 128.9, 133.7, 134.1, 138.0, 154.1, 159.6, 171.7 (quart. C); C₁₉H₁₆N₄O₂ [332.36]: Ber. C: 68.66, H: 4.85, N: 16.86; Gef.

C: 68.42, H: 4.87, N: 16.62; HPLC: t_s : 3.05 min; Reinheit: 99.4%/99.6% [ACN:H₂O (35:65); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m (DMSO): 1.04 min; 100%-Methode]; cLogP: 2.88 ± 0.49

2-(4-Chloranilino)-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-on
(9c)

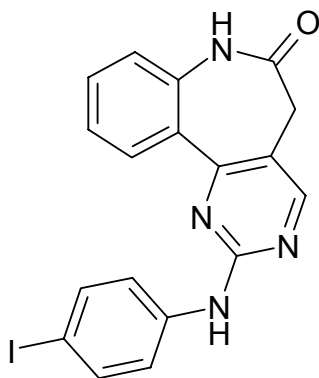


Nach AAV 4 (Methode B) aus 1 mmol (230 mg) 4-[(Dimethylamino)-methyliden]-3,4-dihydro-1H-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.2 mmol (280 mg) 4-Chlorphenylguanidiniumnitrat (**43c**). Reaktionsdauer: 40 min. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 207 mg (61%) farblose Kristalle.

Schmp.: 297-299 °C; IR (KBr): 3268 cm⁻¹ und 3192 cm⁻¹ (NH), 3075 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2973 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1679 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.38 (s, 2H, CH₂), 7.23 („dd“, 1H, J = 8.1/0.7 Hz, ArH), 7.33-7.37 (m, 3H, ArH), 7.56 („dt“, 1H, J = 8.1/7.3/1.6 Hz, ArH), 7.84-7.88 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 8.06 (dd, 1H, J = 7.9/1.5 Hz, ArH), 8.31 (s, 1H,

ArH), 9.90 (s, 1H, NH), 10.25 (s, 1H, NH); C₁₈H₁₃ClN₄O [336.78]:
 Ber. C: 64.19, H: 3.89, N: 16.64; Gef. C: 64.05, H: 3.85, N: 16.44;
 HPLC: t_s: 5.81 min; Reinheit: 99.8%/100.0% [ACN:H₂O (40:60); 15
 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m(DMSO): 1.03 min;
 100%-Methode]; cLogP: 3.93 ± 0.49

2-(4-Iodanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-on
(9d)

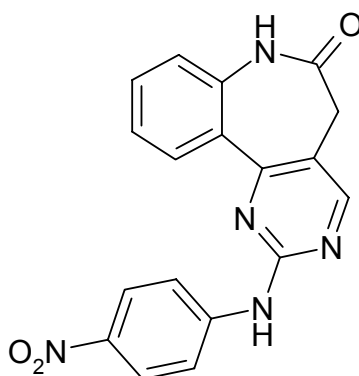


Nach AAV 4 (Methode B) aus 1 mmol (230 mg) 4-[(Dimethylamino)-
 methylen]-3,4-dihydro-1H-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.2
 mmol (325 mg) 4-Iodphenylguanidiniumnitrat (**43d**). Reaktionsdauer:
 45 min. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 200 mg
 (47%) gelbgrüne Kristalle.

Schmp.: 295 °C (unter Zerstörung); IR (KBr): 3266 cm⁻¹ und 3186
 cm⁻¹ (NH), 3088 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2969 cm⁻¹ und 2905 cm⁻¹
 (CH aliphatisch), 1673 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz):
 δ (ppm) = 3.38 (s, 2H, CH₂), 7.23 (dd, 1H, J = 8.0/0.9 Hz, ArH), 7.35
 („dt“, 1H, J = 8.0/7.2/0.9 Hz, ArH), 7.56 („dt“, 1H, J = 8.2/7.2/1.6 Hz,

ArH), 7.60-7.62 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.67-7.70 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 8.06 (dd, 1H, $J = 8.2/1.4$ Hz, ArH), 8.53 (s, 1H, ArH), 9.87 (s, 1H, NH), 10.24 (s, 1H, NH); $C_{18}H_{13}N_4O$ [428.23]: Ber. C: 50.49, H: 3.06, N: 13.08; Gef. C: 50.85, H: 3.13, N: 12.72; HPLC: t_s : 3.70 min; Reinheit: 97.0%/97.5% [ACN:H₂O (50:50); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m (DMSO): 1.02 min; 100%-Methode]; cLogP: 4.36 ± 0.55

2-(4-Nitroanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-on
(9e)

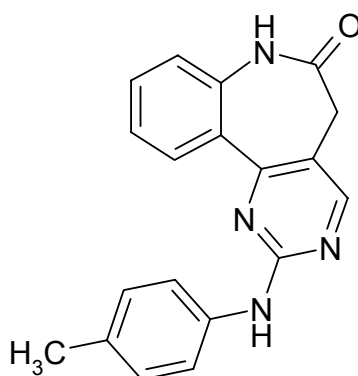


Nach AAV 4 (MethodeB) aus 1 mmol (238 mg) 4-[(Dimethylamino)-methyliden]-3,4-dihydro-1H-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.2 mmol (293 mg) 4-Nitrophenylguanidiniumnitrat (**43e**). Reaktionsdauer: 60 min. Nach Aufkochen in Ethanol erhält man 234 mg (65%) eines hellbraunen Pulvers.

Schmp.: 325-326 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3272 cm^{-1} und 3197 cm^{-1} (NH), 3069 cm^{-1} (CH aromatisch), 2965 cm^{-1} und 2893 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1670 cm^{-1} (C=O); 1H -NMR ([D₆]DMSO, 400

MHz): δ (ppm) = 3.44 (s, 2H, CH₂), 7.26 (dd, 1H, J = 8.1/0.8 Hz, ArH), 7.38 („dt“, 1H, J = 7.8/7.3/1.0 Hz, ArH), 7.59 („dt“, 1H, J = 8.1/7.3/1.5 Hz, ArH), 8.06-8.10 und 8.11 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH und dd, 1H, J = 7.8/1.5 Hz, ArH; Überlagerung), 8.20-8.24 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 8.65 (s, 1H, ArH), 10.29 (s, 1H, NH), 10.57 (s, 1H, NH); C₁₈H₁₃N₅O₃ [347.33]: Ber. C: 62.24, H: 3.77, N: 20.16; Gef. C: 61.97, H: 3.84, N: 19.89; HPLC: t_s : 3.00 min; Reinheit: 99.5%/98.6% [ACN:H₂O (30:70); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m (DMSO): 1.03 min; 100%-Methode]; cLogP: 3.39 \pm 0.50

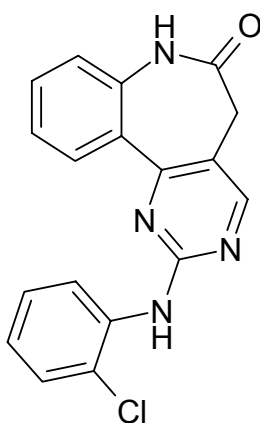
2-(4-Methylanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-on (9f)



Nach AAV 4 (Methode B) aus 1 mmol (232 mg) 4-[(Dimethylamino)-methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.2 mmol (325 mg) 4-Methylphenylguanidiniumnitrat (**43f**). Reaktionsdauer: 45 min. Nach zweifacher Umkristallisation aus Ethanol erhält man 152 mg (48%) hellgelbe Kristalle.

Schmp.: 287-289 °C; IR (KBr): 3279 cm⁻¹ und 3189 cm⁻¹ (NH), 3052 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2962 cm⁻¹ und 2912 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1683 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.25 (s, 3H, CH₃), 3.35 (s, 2H, CH₂), 7.09-7.11 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.23 (dd, 1H, *J* = 8.1/0.8 Hz, ArH), 7.34 („dt“, 1H, *J* = 7.8/7.3/1.0 Hz, ArH), 7.55 („dt“, 1H, *J* = 8.1/7.3/1.5 Hz, ArH), 7.68-7.70 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 8.06 (dd, 1H, *J* = 7.8/1.5 Hz, ArH), 8.48 (s, 1H, ArH), 9.60 (s, 1H, NH), 10.21 (s, 1H, NH); C₁₉H₁₆N₄O [316.36]: Ber. C: 72.13, H: 5.10, N: 17.71; Gef. C: 72.05, H: 5.06, N: 17.55; HPLC: t_s: 1.95 min; Reinheit: 99.6%/99.8% [ACN:H₂O (45:55); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m(DMSO): 1.02 min; 100%-Methode]; cLogP: 3.40 ± 0.48

2-(2-Chloranilino)-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-on
(**9q**)

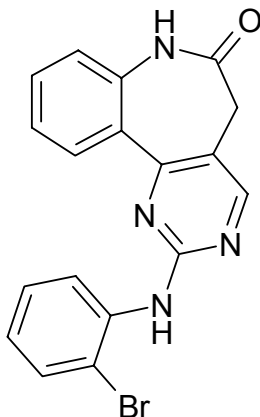


Nach AAV 4 (Methode B) aus 1 mmol (229 mg) 4-[(Dimethylamino)-methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.2

mmol (280 mg) 2-Chlorphenylguanidiniumnitrat (**43g**). Reaktionsdauer: 60 min. Nach Umkristallisation aus Ethylacetat erhält man 217 mg (65%) farblose Kristalle.

Schmp.: 279-280 °C; IR (KBr): 3411 cm⁻¹ und 3185 cm⁻¹ (NH), 3067 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2964 cm⁻¹ und 2909 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1692 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.36 (s, 2H, CH₂), 7.16 („dt“, 1H, *J* = 7.8/7.6/1.5 Hz, ArH), 7.21 (dd, 1H, *J* = 8.1/1.0 Hz, ArH), 7.29 („dt“, 1H, *J* = 7.8/7.3/1.0 Hz, ArH), 7.35 („dt“, 1H, *J* = 8.1/7.6/1.3 Hz, ArH), 7.51 und 7.53 (dd, 1H, *J* = 7.8/1.5 Hz, ArH und „dt“, 1H, *J* = 8.1/7.3/1.5 Hz, ArH, Überlagerung), 7.89 (dd, 1H, *J* = 8.1/1.5 Hz, ArH), 7.98 (dd, 1H, *J* = 8.1/1.5 Hz, ArH), 8.47 (s, 1H, ArH), 8.88 (s, 1H, NH), 10.22 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 36.2 (CH₂); 121.0, 123.8, 125.1, 125.4, 127.4, 129.4, 129.9, 131.2, 157.5 (tert. C); 117.9, 127.0, 128.5, 136.5, 138.1, 159.7, 160.7, 171.5 (quart. C); C₁₈H₁₃ClN₄O [336.77]: Ber. C: 64.19, H: 3.89, N: 16.64; Gef. C: 63.79, H: 3.86, N: 16.25; HPLC: t_s: 3.96 min; Reinheit: 99.6%/99.7% [ACN:H₂O (50:50); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m(DMSO): 1.02 min; 100%-Methode]; cLogP: 3.44 ± 0.49

2-(2-Bromanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-on
(9h)

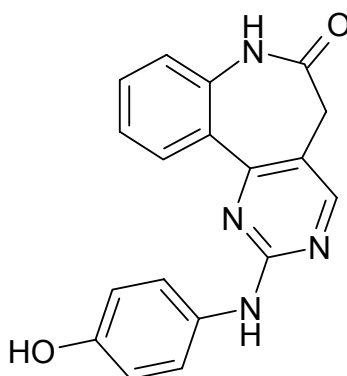


Nach AAV 4 (Methode B) aus 1 mmol (242 mg) 4-[(Dimethylamino)-methyliden]-3,4-dihydro-1H-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.2 mmol (332 mg) 2-Bromphenylguanidiniumnitrat (**43h**). Reaktionsdauer: 45 min. Nach Umkristallisation aus Ethylacetat erhält man 212 mg (53%) farblose Kristalle.

Schmp.: 285-286 °C; IR (KBr): 3394 cm⁻¹ und 3185 cm⁻¹ (NH), 3066 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2964 cm⁻¹ und 2908 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1692 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.36 (s, 2H, CH₂), 7.09 („dt“, 1H, *J* = 7.8/7.6/1.5 Hz, ArH), 7.21 (dd, 1H, *J* = 8.1/0.5 Hz, ArH), 7.29 („dt“, 1H, *J* = 8.3/7.8/1.0 Hz, ArH), 7.40 („dt“, 1H, *J* = 8.1/7.3/1.5 Hz, ArH), 7.53 („dt“ 1H, *J* = 8.1/7.3/1.5 Hz, ArH), 7.68 (dd, 1H, *J* = 8.1/1.3 Hz, ArH), 7.86 (dd, 1H, *J* = 8.1/1.5 Hz, ArH), 7.97 (dd, 1H, *J* = 7.8/1.5 Hz, ArH), 8.46 (s, 1H, ArH), 8.81 (s, 1H, NH), 10.22 (s, 1H, NH); C₁₈H₁₃BrN₄O [381.23]: Ber. C: 56.71, H: 3.44, N: 14.70; Gef. C: 56.34, H: 3.35, N: 14.22; HPLC: t_s: 4.40 min; Reinheit: 99.2%/99.5% [ACN:H₂O (50:50); 15 min; Flussrate:

1.000 ml/min; 254/280 nm; $t_m(\text{DMSO})$: 1.02 min; 100%-Methode];
cLogP: 3.62 ± 0.55

2-(4-Hydroxyanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-on (9i)

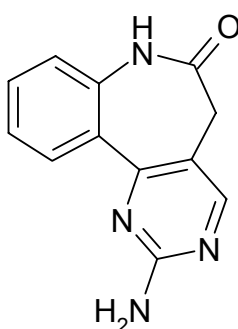


Nach AAV 4 (Methode B) aus 1 mmol (236 mg) 4-[(Dimethylamino)-methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.2 mmol (220 mg) 4-Hydroxyphenylguanidiniumnitrat (**43i**). Reaktionsdauer: 30 min. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 231 mg (71%) gelbgrüne Kristalle.

Schmp.: 356-357 °C; IR (KBr): 3260 cm^{-1} und 3198 cm^{-1} (NH; OH (breit) überdeckt), 3050 cm^{-1} (CH aromatisch), 2963 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1659 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.32 (s, 2H, CH_2 teilweise vom Wasserpeak überdeckt), 6.69-6.72 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.23 (dd, 1H, $J = 8.1/1.0$ Hz, ArH), 7.32 („dt“, 1H, $J = 7.1/8.1/1.0$ Hz, ArH), 7.51-7.55 (m, 3H, ArH), 8.03 (dd, 1H, $J = 7.8/1.5$ Hz, ArH), 8.41 (s, 1H, ArH), 9.01 (s, 1H, OH), 9.35 (s, 1H, NH), 10.18 (s, 1H, NH); $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$

[318.33]: Ber. C: 67.91, H: 4.43, N: 17.60; Gef. C: 67.58, H: 4.53, N: 17.24; HPLC: t_R : 2.21 min; Reinheit: 98.4%/99.8% [ACN:H₂O/TFA (25:75); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m (DMSO): 1.04 min; 100%-Methode]; cLogP: 2.19 \pm 0.48

2-Amino-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-on (**9j**)

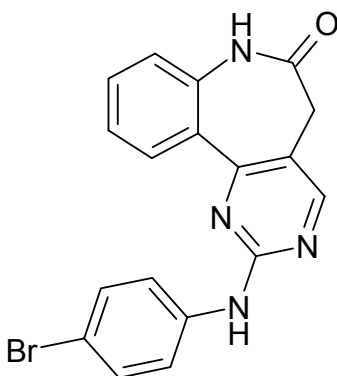


Nach AAV 4 (Methode B) aus 1 mmol (234 mg) 4-[(Dimethylamino)-methylen]-3,4-dihydro-1H-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.2 mmol (148 mg) Guanidiniumnitrat (**43j**). Reaktionsdauer: 60 min. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 159 mg (69%) farblose Kristalle.

Schmp.: 326 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3359 cm⁻¹ und 3312 cm⁻¹ (NH₂), 3186 cm⁻¹ (Lactam-NH), 3055 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2966 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1684 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.25 (s, 2H, CH₂), 6.68 (s, 2H, NH₂), 7.18 (dd, 1H, J = 8.1/0.9 Hz, ArH), 7.27 („dt“, 1H, J = 7.3/7.8/1.2 Hz, ArH), 7.50 („dt“, 1H, J = 8.1/7.3/1.6 Hz, ArH), 7.95 (dd, 1H, J = 7.8/1.6 Hz, ArH), 8.25 (s, 1H, ArH), 10.12 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 36.1 (CH₂); 121.9, 123.6, 129.8, 130.8, 157.5

(tert. C); 115.3, 129.0, 137.9, 160.6, 163.2, 171.8 (quart. C); C₁₂H₁₀N₄O [226.23]: Ber. C: 63.71, H: 4.46, N: 24.77; Gef. C: 63.56, H: 4.43, N: 24.43; HPLC: t_s: 2.15 min; Reinheit: 98.9%/98.5% [ACN:H₂O (15:85); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m(DMSO): 1.09 min; 100%-Methode]; cLogP: 0.80 ± 0.30

2-(4-Bromanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-on
(**9k**)

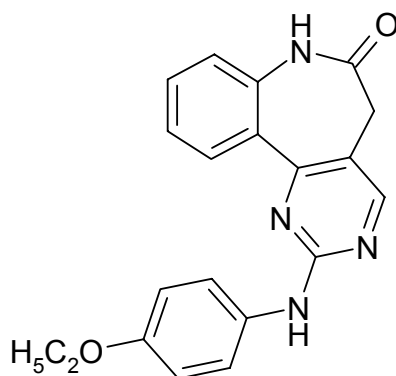


Nach AAV 4 (Methode B) aus 1 mmol (231 mg) 4-[(Dimethylamino)-methylen]-3,4-dihydro-1H-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.2 mmol (330 mg) 4-Bromphenylguanidiniumnitrat (**43k**). Reaktionsdauer: 30 min. Nach Umkristallisation aus Ethylacetat erhält man 108 mg (28%) eines hellbraunen Pulvers.

Schmp.: 303 °C; IR (KBr): 3263 cm⁻¹ und 3192 cm⁻¹ (NH), 3079 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2971 cm⁻¹ und 2884 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1673 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.38 (s, 2H, CH₂), 7.24 (dd, 1H, J = 8.1/0.8 Hz, ArH), 7.35 („dt“, 1H, J =

7.8/7.3/1.0 Hz, ArH), 7.45-7.49 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.56 („dt“, 1H, $J = 8.1/7.1/1.5$ Hz, ArH), 7.79-7.83 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 8.07 (dd, 1H, $J = 7.8/1.5$ Hz, ArH), 8.53 (s, 1H, ArH), 9.90 (s, 1H, NH), 10.25 (s, 1H, NH); $C_{18}H_{13}BrN_4O$ [381.23]: Ber. C: 56.71, H: 3.44, N: 14.70; Gef. C: 56.66, H: 3.41, N: 14.48; HPLC: t_s : 4.49 min; Reinheit: 100.0%/100.0% [ACN:H₂O (50:50); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m (DMSO): 1.02 min; 100%-Methode]; cLogP: 4.10 ± 0.55

2-(4-Ethoxyanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-6-on (9I)

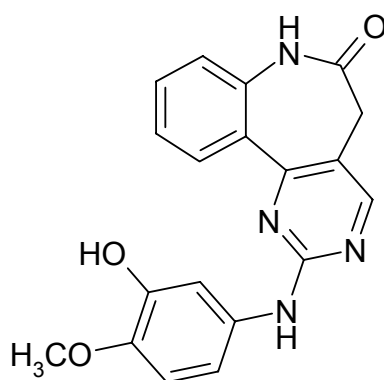


Nach AAV 4 (Methode B) aus 1 mmol (239 mg) 4-[(Dimethylamino)-methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.2 mmol (296 mg) 4-Ethoxyphenylguanidiniumnitrat (**43I**). Reaktionsdauer: 30 min. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 203 mg (56%) hellgrüne Kristalle.

Schmp.: 249 °C; IR (KBr): 3292 cm⁻¹ und 3192 cm⁻¹ (NH), 3067 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2969 cm⁻¹ und 2909 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1691

cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.31 (t, 3H, *J* = 6.8 Hz, CH₃ (Ethoxy)), ~ 3.33 (CH₂ vom Wasserpeak überdeckt), 3.99 (q, 2H, *J* = 6.8 Hz, CH₂ (Ethoxy)), 6.85-6.89 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.22 (dd, 1H, *J* = 8.1/0.8 Hz, ArH), 7.33 („dt“, 1H, *J* = 8.3/7.8/1.0 Hz, ArH), 7.56 („dt“, 1H, *J* = 8.1/7.1/1.5 Hz, ArH), 7.66-7.70 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 8.05 (dd, 1H, *J* = 7.8/1.5 Hz, ArH), 8.44 (s, 1H, ArH), 9.51 (s, 1H, NH), 10.21 (s, 1H, NH); C₂₀H₁₈N₄O₂ [346.38]: Ber. C: 69.35, H: 5.24, N: 16.17; Gef. C: 68.98, H: 5.35, N: 15.92; HPLC: t_s: 2.75 min; Reinheit: 99.9%/99.9% [ACN:H₂O (50:50); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m(DMSO): 1.02 min; 100%-Methode]; cLogP: 3.42 ± 0.49

2-(3-Hydroxy-4-methoxyanilino)-5,7-dihydro-6*H*-pyrimido[5,4-*d*]-[1]benzazepin-6-on (**9m**)

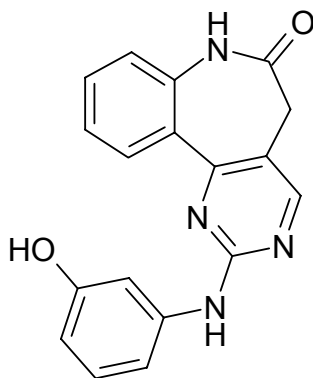


Nach AAV 4 (Methode B) aus 1 mmol (237 mg) 4-[(Dimethylamino)-methylen]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.2 mmol (297 mg) 3-Hydroxy-4-methoxyphenylguanidiniumnitrat (**43m**).

Reaktionsdauer: 30 min. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 203 mg (56%) hellgrüne Kristalle.

Schmp.: 272 °C; IR (KBr): 3372 cm⁻¹ und 3318 cm⁻¹ (NH), 3061 cm⁻¹ (CH aromatisch; OH (breit) überdeckt), 2997 cm⁻¹ und 2828 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1685 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.34 (s, 2H, CH₂), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 6.84 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, ArH), 7.18 (dd, 1H, *J* = 8.6/2.5 Hz, ArH), 7.22 (dd, 1H, *J* = 8.1/1.0 Hz, ArH), 7.31 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, ArH), 7.34 (dd, 1H, *J* = 8.3/1.3 Hz, ArH), 7.54 („dt“, 1H, *J* = 8.1/7.3/1.5 Hz, ArH), 8.07 (dd, 1H, *J* = 8.1/1.5 Hz, ArH), 8.44 (s, 1H, ArH), 8.87 (s, 1H, OH), 9.42 (s, 1H, NH), 10.20 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 56.1 (OCH₃); 36.2 (CH₂); 107.8, 109.8, 112.7, 122.0, 123.9, 129.9, 131.1, 157.3 (tert. C); 116.8, 128.9, 134.3, 138.0, 142.7, 146.3, 159.6, 160.5, 171.7 (quart. C); C₁₉H₁₆N₄O₃ [348.36]: Ber. C: 65.51, H: 4.63, N: 16.08; Gef. C: 65.22, H: 4.74, N: 15.66; HPLC: t_s: 3.98 min; Reinheit: 95.9%/97.4% [ACN:H₂O (30:70); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m(DMSO): 1.03 min; 100%-Methode]; cLogP: 2.32 ± 0.50

2-(3-Hydroxyanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-on (9n)

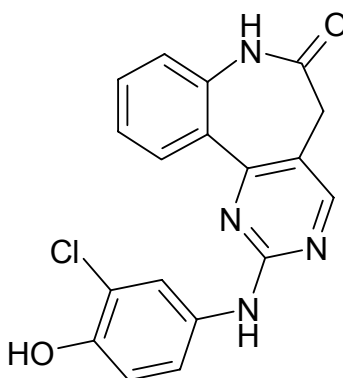


Nach AAV 4 (Methode B) aus 1 mmol (242 mg) 4-[(Dimethylamino)-methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.2 mmol (264 mg) 3-Hydroxyphenylguanidiniumnitrat (**43n**). Reaktionsdauer: 30 min. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 154 mg (46%) feine beigefarbene Kristalle.

Schmp.: 288-289 °C; IR (KBr): 3432 cm⁻¹ (NH), 3210 cm⁻¹ (NH; OH (breit) überdeckt), 3102 cm⁻¹ und 3052 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2976 cm⁻¹ und 2908 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1656 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.37 (s, 2H, CH₂), 6.38 (dd, 1H, *J* = 8.1/1.5 Hz, ArH), 7.22 („t“, 1H, *J* = 8.1/7.8 Hz, ArH), 7.22 und 7.23 (dd, 1H, *J* = 8.1/1.3 Hz, ArH und dd 1H, *J* = 8.1/0.8 Hz, ArH, Überlagerung), 7.33-7.37 (m, 2H, ArH), 7.56 („dt“, 1H, *J* = 8.1/7.3/1.5 Hz, ArH), 8.09 (dd, 1H, *J* = 7.8/1.5 Hz, ArH), 8.50 (s, 1H, ArH), 9.25 (s, 1H, OH), 9.60 (s, 1H, NH), 10.23 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 36.2 (CH₂); 105.9, 108.6, 109.7, 122.1, 123.9, 129.0, 130.0, 131.1, 157.4 (tert. C); 117.3, 128.8, 138.1, 141.6, 157.3, 159.5, 160.6, 171.6 (quart. C);

C₁₈H₁₄N₄O₂ [318.33]: Ber. C: 67.91, H: 4.43, N: 17.60; Gef. C: 67.57, H: 4.59, N: 17.25; HPLC: t_s: 3.73 min; Reinheit: 99.8%/100.0% [ACN:H₂O (30:70); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m(DMSO): 1.03 min; 100%-Methode]; cLogP: 2.58 ± 0.49

2-(3-Chlor-4-hydroxyanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-on (9o)

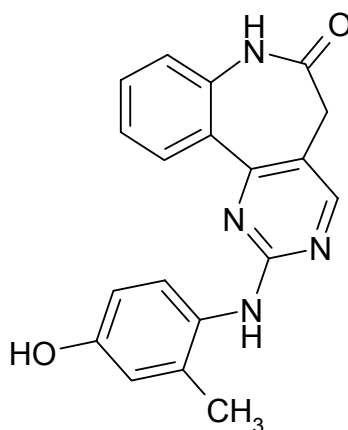


Nach AAV 4 (Methode A) aus 1 mmol (240 mg) 4-[(Dimethylamino)-methylen]-3,4-dihydro-1H-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.2 mmol (305 mg) 3-Chlor-4-hydroxyphenylguanidiniunitrat (**43o**). Reaktionsdauer: 10 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 160 mg (44%) gelbe Kristalle.

Schmp.: ab 293 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3256 cm⁻¹ und 3194 cm⁻¹ (NH; OH (breit) überdeckt), 3101 cm⁻¹ (CH aromatisch), 1662 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.35 (s, 2H, CH₂), 6.91 (d, 1H, J = 8.8 Hz, ArH), 7.23 (dd, 1H, J = 8.3/0.8 Hz, ArH), 7.33 („dt“, 1H, J = 8.3/7.8/1.0 Hz, ArH), 7.49 (dd, 1H, J = 8.8/2.5 Hz,

ArH), 7.55 („dt“, 1H, $J = 8.1/7.3/1.5$ Hz, ArH), 7.91 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz, ArH), 8.05 (dd, 1H, $J = 7.8/1.5$ Hz, ArH), 8.48 (s, 1H, ArH), 9.59 (s, 1H, OH), 9.68 (s, 1H, NH), 10.23 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 100.6 MHz): δ (ppm) = 36.0 (CH_2); 116.4, 119.01, 120.3, 122.1, 123.9, 129.8, 131.2, 157.4 (tert. C); 117.1, 118.98, 128.7, 133.1, 138.1, 147.6, 159.4, 160.5, 171.6 (quart. C); $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{O}_2$ [352.77]: Ber. C: 61.28, H: 3.71, N: 15.88; Gef. C: 61.11, H: 3.61, N: 15.49; HPLC: t_s : 4.47 min; Reinheit: 94.6%/95.4% [ACN:H₂O (30:70); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; $t_m(\text{DMSO})$: 1.03 min; 100%-Methode]; cLogP: 3.18 ± 0.50

2-(4-Hydroxy-2-methylanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-*d*]-[1]benzazepin-6-on (**9p**)

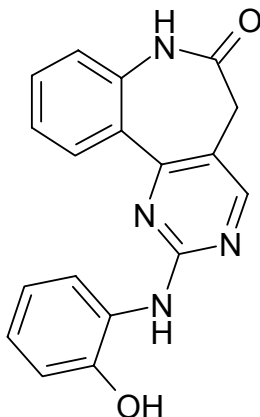


Nach AAV 4 (Methode B) aus 1 mmol (240 mg) 4-[(Dimethylamino)-methyliden]-3,4-dihydro-1H-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.2 mmol (283 mg) 4-Hydroxy-2-methylphenylguanidiniumnitrat (**43p**).

Reaktionsdauer: 30 min. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 203 mg (56%) feine gelbgrüne Kristalle.

Schmp.: ab 293 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3272 cm⁻¹, 3217 cm⁻¹ und 3130 cm⁻¹ (NH; OH (breit) überdeckt), 3073 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2918 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1666 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.12 (s, 3H, CH₃), 3.28 (s, 2H, CH₂), 6.58 (dd, 1H, *J* = 8.6/2.5 Hz, ArH), 6.64 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, ArH), 7.13 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, ArH), 7.18 (dd, 1H, *J* = 8.1/0.5 Hz, ArH), 7.26 („dt“, 1H, *J* = 8.3/7.8/1.0 Hz, ArH), 7.50 („dt“, 1H, *J* = 8.1/7.3/1.5 Hz, ArH), 7.89 (dd, 1H, *J* = 7.3/0.5 Hz, ArH), 8.31 (s, 1H, ArH), 8.64 (s, 1H, OH), 9.14 (s, 1H, NH), 10.16 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 17.9 (CH₃); 35.9 (CH₂); 112.6, 116.5, 121.9, 123.7, 127.4, 129.8, 130.9, 157.4 (tert. C); 116.1, 128.9, 129.3, 134.8, 137.9, 154.6, 160.6, 161.3, 171.7 (quart. C); C₁₉H₁₆N₄O₂ [332.36]: Ber. C: 68.66, H: 4.85, N: 16.86; Gef. C: 68.27, H: 4.77, N: 16.62; HPLC: t_s: 2.63 min; Reinheit: 99.9%/100.0% [ACN:H₂O (30:70); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m(DMSO): 1.03 min; 100%-Methode]; cLogP: 2.65 ± 0.48

2-(2-Hydroxyanilino)-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-on (9q)

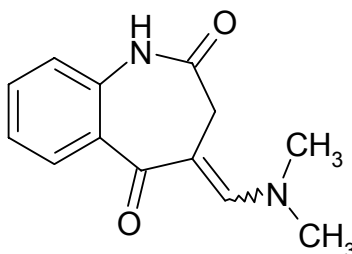


Nach AAV 4 (Methode B) aus 1 mmol (234 mg) 4-[(Dimethylamino)-methylen]-3,4-dihydro-1H-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.2 mmol (259 mg) 2-Hydroxyphenylguanidiniumnitrat (**43q**). Reaktionsdauer: 30 min. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 112 mg (35%) feine gelbgrüne Kristalle.

Schmp.: 262-263 °C; IR (KBr): 3364 cm^{-1} und 3192 cm^{-1} (NH), 3075 cm^{-1} (CH aromatisch; OH (breit) überdeckt), 2971 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1684 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.37 (s, 2H, CH_2), 6.80-6.90 (m, 3H, ArH), 7.23 („d“, 1H, J = 8.1 Hz, ArH), 7.34 („t“, 1H, J = 7.3/7.3 Hz, ArH), 7.56 („dt“, 1H, J = 8.3/7.1/1.3 Hz, ArH), 8.04 (dd, 1H, J = 7.8/1.0 Hz, ArH), 8.09 („d“, 1H, J = 7.6 Hz, ArH), 8.23 (s, 1H, ArH), 8.50 (s, 1H, OH), 9.94 (s, 1H, NH), 10.25 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 36.2 (CH_2); 115.1, 119.1, 120.4, 122.1, 122.8, 124.0, 129.8, 131.3, 157.6 (tert. C); 117.4, 127.8, 128.6, 138.1, 147.1, 159.4, 160.7, 171.6 (quart. C); $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$ [318.33]: Ber. C: 67.91,

H: 4.43, N: 17.60; Gef. C: 67.50, H: 4.69, N: 17.24; HPLC: t_s : 5.59 min; Reinheit: 96.6%/97.9% [ACN:H₂O (30:70); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m (DMSO): 1.03 min; 100%-Methode]; cLogP: 2.57 ± 0.49

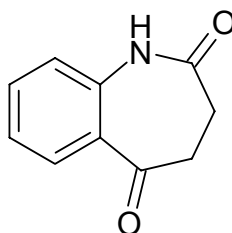
4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**)



15 mmol (2.6 g) 3,4-Dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**19**) werden für 1 h bei 115-120 °C in 50 ml Dimethylformamid/dimethylacetal gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Niederschlag abgesaugt und mit Ethanol und Petroläther gewaschen. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 2.7 g (77%) gelbe Kristalle.

Schmp.: 222-223 °C (Lit.³⁶: 218-220 °C); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 43.5 (2C, schwach) (CH₃); 31.2 (CH₂); 121.1, 123.5, 130.4, 131.1, 150.2 (tert. C); 99.4, 132.8, 137.3, 172.9, 187.9 (quart. C)

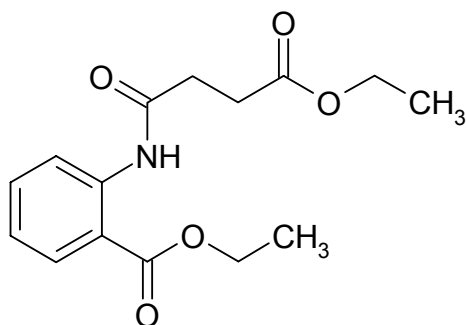
3,4-Dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**19**)



10 mmol (2.5 g) 5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-4-carbonsäureethylester (**23**) werden mit 0.35 ml Wasser in 25 ml DMSO bei 150 °C unter Stickstoff gerührt. Nach 1 h und nach 3 h werden abermals 0.35 ml Wasser zugegeben. Nach ca. 4 h lässt man auf Raumtemperatur abkühlen und gießt in 200 ml Wasser. Das Gemisch wird 12 h im Kühlschrank aufbewahrt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser und Petroläther gewaschen. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 1.4 g (78%) farblose Kristalle.

Schmp.: 187 °C (Lit.¹⁴¹: 187-188 °C)

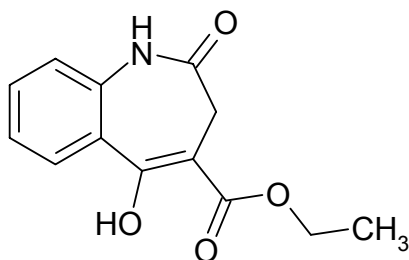
2-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]benzoesäureethylester (**22**)



Zu einem gekühlten Gemisch aus 180 mmol (29.7 g) Anthranilsäureethylester (**20**), 20 ml Pyridin und 75 ml Toluol wird unter Rühren eine Lösung von 218 mmol (36.0 g) Bernsteinsäureethylesterchlorid (**21**) in 25 ml Toluol langsam zugetropft. Die entstandene Suspension wird 2 h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit 30 ml Wasser versetzt. Die wässrige Phase wird mit einem Scheidetrichter abgetrennt und verworfen. Die organische Phase wird nacheinander mit 30 ml 10proz. Salzsäure und 30 ml 5proz. Natriumcarbonat-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingeeengt. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 47.1 g (89%) farbloser Kristalle.

Schmp.: 60 °C (Lit.¹⁴²: 60 °C)

5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1H-[1]benzazepin-4-carbonsäureethylester (**23**)



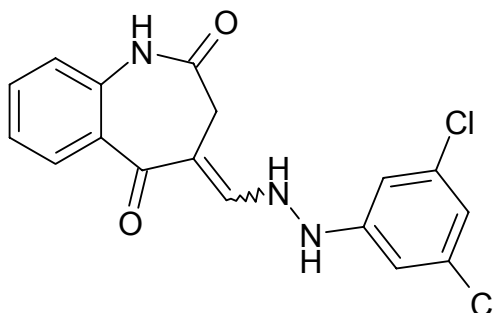
Alle Arbeitsschritte bis einschließlich des Zutropfens von Wasser werden unter Stickstoffatmosphäre (Einleiten von Stickstoff) durchgeführt! 0.25 mol (10.0 g) Kaliumhydrid (Vorsicht! Kaliumhydrid entzündet sich sofort bei Kontakt mit Wasser oder Feuchtigkeit!)*

werden unter Stickstoff dreimal mit je 50 ml Toluol gewaschen und dann in 75 ml Toluol suspendiert. Die Suspension wird mit einem Ölbad gekühlt. 50 mmol (14.7 g) 2-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]-benzoesäureethylester (**22**) werden in 20 ml *N,N*-Dimethylformamid und 150 ml Toluol gelöst und über einen Tropftrichter in die gekühlte Suspension getropft. Nach beendeter Gasentwicklung wird etwa 2 h bei 70-80 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden zunächst vorsichtig 15 ml Eisessig und dann 150 ml Wasser zugetropft, anschließend wird im Eisbad gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser und Petroläther gewaschen. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 9.9 g (80%) farblose Kristalle.

* Gefahrstoff! Siehe auch Anhang zu Kap. 8.2.

Schmp.: 210-211 °C (Lit.⁵⁴: 210-213 °C)

4-[[2-(3,5-Dichlorophenyl)hydrazino]methylen]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**31h**)

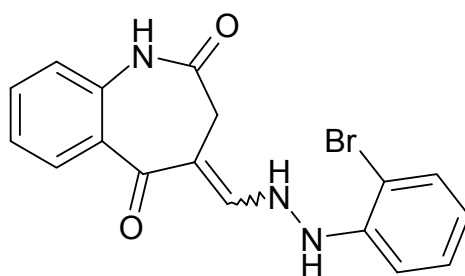


Nach AAV 2 aus 1 mmol (229 mg) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.5 mmol (320 mg)

3,5-Dichlorphenylhydrazin-Hydrochlorid (**29h**). Umkristallisation aus 70%igem Ethanol ergibt 178 mg (49%) beigefarbene Kristalle.

Schmp.: 219-222 °C; IR (KBr): 3188 cm⁻¹ (NH), 3070 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2965 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1688 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.98 (s, 2H, CH₂), 6.82 („t“, 1H, *J* = 1.8 Hz, ArH), 6.91 („d“, 2H, *J* = 1.3 Hz, ArH), 7.15 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 7.20 („dt“, 1H, *J* = 7.2/8.1/1.0 Hz, ArH), 7.40 („dt“, 1H, *J* = 6.9/8.3/1.4 Hz, ArH), 7.70 (dd, 1H, *J* = 8.1/1.3 Hz, ArH), 8.17 (s, 1H, ArH), 9.62 (s, 1H, NH), 10.19 (s, 1H, NH), 10.57 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.1 (CH₂); 109.7 (2C), 116.7, 121.3, 123.0, 127.8, 129.5, 138.7 (tert. C); 108.2, 127.4, 134.6 (2C), 136.6, 147.5, 151.2, 172.0 (quart. C); C₁₇H₁₃Cl₂N₃O₂ [362.21]: Ber. C: 56.37, H: 3.62, N: 11.60; Gef. C: 55.90, H: 3.42, N: 11.24; HPLC: t_s: 2.67 min; Reinheit: 95.4%/91.8% [ACN:H₂O (60:40); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m(DMSO): 1.04 min; 100%-Methode]; cLogP: 5.83 ± 0.66

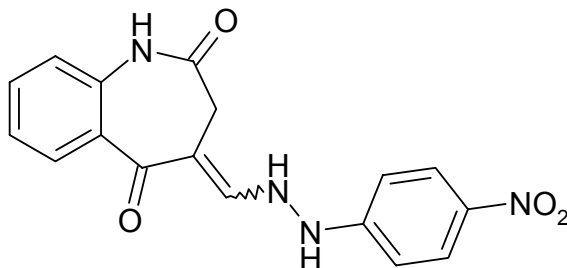
4-{[2-(2-Bromophenyl)hydrazino]methylen}-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**31m**)



Nach AAV 2 aus 1 mmol (230 mg) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.5 mmol (335 mg) 2-Bromphenylhydrazin-Hydrochlorid (**29m**). Nach Umkristallisation aus 70%igem Ethanol erhält man 223 mg (60%) braune Kristalle.

Schmp.: 212 °C unter Zersetzung; IR (KBr): 3430 cm⁻¹, 3324 cm⁻¹ und 3198 cm⁻¹ (NH), 3099 cm⁻¹ und 3055 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2957 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1647 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.99 (s, 2H, CH₂), 6.72 („dt“, 1H, *J* = 7.2/7.9/1.6 Hz, ArH), 7.15 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, ArH), 7.20 („dt“, 1H, *J* = 7.3/7.9/0.9 Hz, ArH), 7.30 („dt“, 1H, *J* = 7.2/8.2/1.0 Hz, ArH), 7.37-7.42 (m, 2H, ArH), 7.47 (dd, 1H, *J* = 7.8/1.3 Hz, ArH), 7.72 (dd, 1H, *J* = 7.9/1.4 Hz, ArH), 8.45 (s, 1H, ArH), 9.48 (s, 1H, NH), 9.81 (s, 1H, NH), 10.18 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.8 (CH₂); 114.0, 119.9, 121.3, 123.0, 127.9, 128.5, 129.5, 132.5, 141.2 (tert. C); 106.0, 107.5, 127.7, 136.6, 142.6, 152.9, 172.1 (quart. C); C₁₇H₁₄BrN₃O₂ [372.22]: Ber. C: 54.86, H: 3.79, N: 11.29; Gef. C: 54.84, H: 3.80, N: 11.22; HPLC: t_s: 3.61 min; Reinheit: 94.4%/92.3% [ACN:H₂O (50:50); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m(DMSO): 1.02 min; 100%-Methode]; cLogP: 4.45 ± 0.67

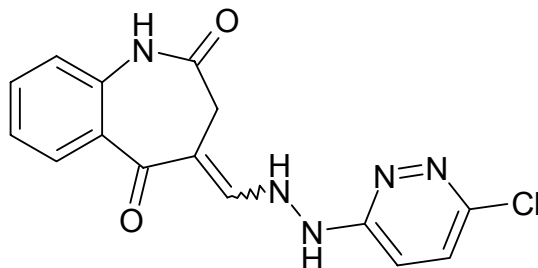
4-{[2-(4-Nitrophenyl)hydrazino]methylen}-3,4-dihydro-1H-[1]benzazepin-2,5-dion (**31o**)



Nach AAV 2 aus 1 mmol (229 mg) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.5 mmol (231 mg) 4-Nitrophenylhydrazin-Hydrochlorid (**29o**). Die Reinigung erfolgt durch Aufkochen in Ethanol und ergibt 257 mg (76%) rote Kristalle.

Schmp.: 249 °C; IR (KBr): 3335 cm⁻¹ (NH), 3236 cm⁻¹ (NH), 1679 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.02 (s, 2H, CH₂), 7.06-7.24 (m, 4H, ArH), 7.42 („dt“, 1H, *J* = 7.1/8.2/1.3 Hz, ArH), 7.71 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, ArH), 8.12-8.14 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 8.33 (s, 1H, ArH), 9.76 (s, 1H, NH), 10.22 (s, 1H, NH), 11.19 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 30.9 (CH₂); 110.8, 121.4 (2C), 123.1, 126.2 (2C), 127.9, 129.8, 140.9 (tert. C); 108.2, 127.3, 136.8, 137.8, 150.5, 152.1, 172.0 (quart. C); C₁₇H₁₄N₄O₄ [338.32]: Ber. C: 60.35, H: 4.17, N: 16.56; Gef. C: 60.09, H: 4.21, N: 16.07; HPLC: t_s: 2.65 min; Reinheit: 94.1%/95.2% [ACN:H₂O (50:50); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m(DMSO): 1.02 min; 100%-Methode]; cLogP: 4.22 ± 0.65

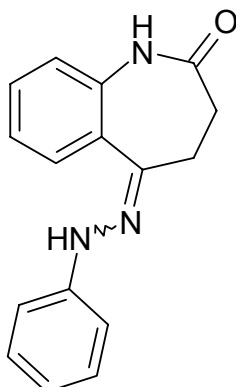
4-{[2-(6-Chloropyridazin-3-yl)hydrazino]methylen}-3,4-dihydro-1H-[1]benzazepin-2,5-dion (**31q**)



Nach AAV 2 aus 1 mmol (230 mg) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 1.5 mmol (218 mg) 3-Chlor-6-Hydrazinopyridazin (**74**). Nach dem Aufkochen in Ethylacetat erhält man 248 mg (80%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 211 °C unter Zersetzung; IR (KBr): 3434 cm^{-1} (NH), 3196 cm^{-1} (NH), 3047 cm^{-1} (CH aromatisch), 2968 cm^{-1} und 2921 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1674 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (CF_3COOD , 400 MHz): δ (ppm) = 3.48 (s, 2H, CH_2), 7.37 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, ArH), 7.53 (t, 1H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 7.69 (t, 1H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 7.77-7.86 (m, 2H, ArH), 7.97 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, ArH), 8.58 (s, 1H, ArH); $^{13}\text{C-NMR}$ (CF_3COOD , 100.6 MHz): δ (ppm) = 32.5 (CH_2); 125.0, 126.6, 129.5, 130.3, 133.3, 139.4, 154.9 (tert. C); 107.1, 116.0, 129.4, 136.8, 151.1, 179.6 (quart. C, ein C nicht detektiert bei 1512 Scans); $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{ClN}_5\text{O}_2$ [329.74]: Ber. C: 54.64, H: 3.67, N: 21.24; Gef. C: 54.44, H: 3.76, N: 20.73; MS (EI): m/z (%) = 120 (100), 329 (10) $[\text{M}]^+$; cLogP: 3.14 ± 0.67

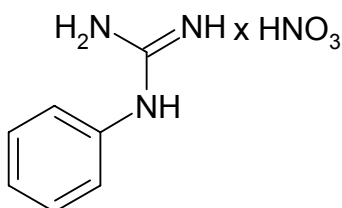
5-Phenylhydrazono-4,5-dihydro-1H-[1]benzazepin-2(3H)-on (37)



2 mmol (361 mg) 1H-[1]Benzazepin-2,5(3H,4H)-dion (**19**) werden mit 3 mmol (300 μ l) Phenylhydrazin (**29a**) in 20 ml Eisessig für 1 h bei 70 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird auf 40 ml 5proz. Natriumacetat-Lösung gegossen, der Niederschlag abgesaugt und mit viel Wasser gewaschen. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 463 mg (85%) gelbe Kristalle.

Schmp.: 246 °C; IR (KBr): 3333 cm^{-1} (NH), 3275 cm^{-1} (NH), 3051 cm^{-1} (CH aromatisch), 1674 ($\text{C}=\text{O}$); ^1H -NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.52-2.55 und 2.96-3.00 (m, AA'XX', 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 6.75-6.79 (m, 1H, ArH), 7.01 (dd, 1H, $J = 7.9/1.0$ Hz, ArH), 7.13-7.23 (m, 5H, ArH), 7.31 („dt“, 1H, $J = 7.4/7.9/1.5$ Hz, ArH), 7.65 (dd, 1H, $J = 7.9/1.5$ Hz, ArH), 9.17 (s, 1H, NH), 9.71 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 29.9, 31.1 (CH_2); 113.2 (2C), 119.5, 122.0, 124.5, 128.9, 129.0 (2C), 129.7 (tert. C); 131.3, 137.2, 143.4, 146.0, 173.3 (quart. C); $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$ [265.31]: Ber. C: 72.43, H: 5.70, N: 15.84; Gef. C: 72.56, H: 5.73, N: 15.90; HPLC: t_s : 7.30 min; Reinheit: 99.4%/99.3%, [ACN:H₂O (40:60); 15 min, Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m (DMSO): 1.03 min; 100%-Methode]; cLogP: 3.32 ± 0.56

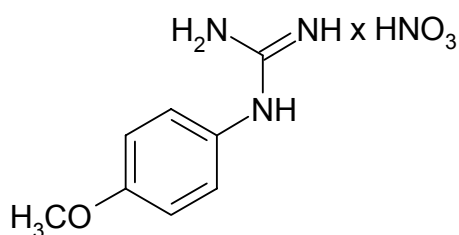
N-Phenylguanidiniumnitrat (**43a**)



Nach AAV 5 (Methode A) aus 40 mmol (3.6 ml) Anilin (**44a**).
Reaktionsdauer: 17 h. Umkristallisation aus 2-Propanol ergibt 4.4 g
(56%) hellviolettfarbene Kristalle.

Schmp.: 114-119 °C; IR (KBr): 3391 cm⁻¹ und 3198 cm⁻¹ (NH (breit)),
3034 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2897 cm⁻¹ und 2857 cm⁻¹ (CH
aliphatisch), 1680 cm⁻¹ (C=N), 1385 cm⁻¹ (Nitrat); ¹H-NMR
([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 7.24 („dd“, 2H, *J* = 8.4/1.1 Hz,
ArH), 7.30 („dt“, 1H, *J* = 7.3/7.6/1.0 Hz, ArH), 7.39 (s, 4H, NH), 7.45
 („dt“, 2H, *J* = 7.6/8.1/1.9 Hz, ArH), 9.66 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR
([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 124.5 (2C), 126.5, 129.7 (2C)
(tert. C); 135.3, 155.7 (quart. C); C₇H₁₀N₄O₃ [198.18]: Ber. C: 42.42,
H: 5.09, N: 28.27; Gef. C: 42.28, H: 5.11, N: 28.17

N-(4-Methoxyphenyl)guanidiniumnitrat (**43b**)



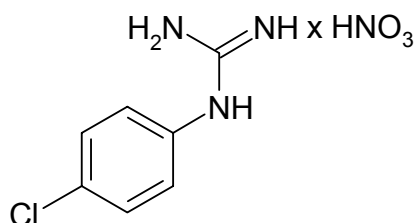
Nach AAV 5 (Methode A) aus 40 mmol (5.0 g) p-Anisidin* (**44b**).
Reaktionsdauer: 16 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 6.1 g (66%) violettfarbene Kristalle.

Nach AAV 5 (Methode B) aus 10 mmol (1.2 g) p-Anisidin* (**44b**).
Reaktionsdauer: 15 min. Nach Umkristallisation aus 1-Butanol erhält man 0.8 g (35%) violettfarbene Kristalle.

* p-Anisidin: T⁺, N (kann Krebs erzeugen), s. Anhang zu Kap. 8.2

Schmp.: 213 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3426 cm⁻¹, 3332 cm⁻¹, 3242 cm⁻¹ und 3186 cm⁻¹ (NH (breit)), 1667 cm⁻¹ (C=N), 1370 cm⁻¹ (Nitrat); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.77 (s, 3H, OCH₃), 6.99-7.02 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.17-7.22 (m, 6H, NH und ArH), 9.39 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.4 (OCH₃); 114.9 (2C), 127.2 (2C) (tert. C); 127.4, 156.2, 158.2 (quart. C); C₈H₁₂N₄O₄ [228.21]: Ber. C: 42.10, H: 5.30, N: 24.55; Gef. C: 42.64, H: 5.35, N: 24.18

N-(4-Chlorphenyl)guanidiniumnitrat (**43c**)



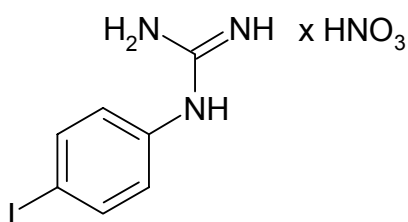
Nach AAV 5 (Methode A) aus 40 mmol (5.1 g) 4-Chloranilin* (**44c**).
Reaktionsdauer: 14 h. Nach Umkristallisation aus 2-Propanol erhält man 5.9 g (64%) violettfarbene Kristalle.

Nach AAV 5 (Methode B) aus 10 mmol (1.3 g) 4-Chloranilin* (**44c**).
Reaktionsdauer: 15 min. Nach Umkristallisation aus 2-Propanol erhält man 0.8 g (33%) violettfarbene Kristalle.

* 4-Chloranilin: T, N (kann Krebs erzeugen), s. Anhang zu Kap. 8.2

Schmp.: 164 °C (unter Zersetzung) (Lit.¹⁴³: 163 °C); IR (KBr): 3388 cm^{-1} und 3190 cm^{-1} (NH (breit)), 3005 cm^{-1} (CH aromatisch), 1679 cm^{-1} (C=N), 1388 cm^{-1} (Nitrat); $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 400 MHz): δ (ppm) = 7.25-7.29 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.44 (s, 4H, NH), 7.48-7.52 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 9.66 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 100.6 MHz): δ (ppm) = 126.6 (2C), 129.6 (2C) (tert. C); 130.8, 134.4, 155.8 (quart. C); $\text{C}_7\text{H}_9\text{ClN}_4\text{O}_3$ [232.62]: Ber. C: 36.14, H: 3.90, N: 24.08; Gef. C: 35.97, H: 3.85, N: 23.81

N-(4-Iodphenyl)guanidiniumnitrat (**43d**)

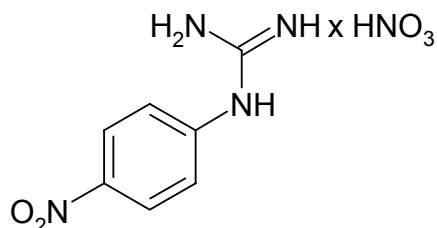


Nach AAV 5 (Methode A) aus 40 mmol (8.8 g) 4-Iodanilin (**44d**).
Reaktionsdauer: 14 h. Nach Umkristallisation aus 2-Propanol erhält man 7.3 g (56%) violettfarbene Kristalle.

Nach AAV 5 (Methode B) aus 10 mmol (2.2 g) 4-Iodanilin (**44d**).
Reaktionsdauer: 15 min. Nach zweifacher Umkristallisation aus 2-Propanol erhält man 1.4 g (43%) violettfarbene Kristalle.

Schmp.: 189 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3437 cm^{-1} , 3348 cm^{-1} , 3233 cm^{-1} (NH (breit)), 1686 cm^{-1} (C=N), 1384 cm^{-1} (Nitrat); ^1H -NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 7.04-7.08 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.44 (s, 4H, NH), 7.76-7.80 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 9.64 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 126.7 (2C), 138.3 (2C) (tert. C); 91.5, 135.3, 155.6 (quart. C); $\text{C}_7\text{H}_9\text{IN}_4\text{O}_3$ [324.08]; Ber. C: 25.94, H: 2.80, N: 17.29; Gef. C: 26.05, H: 2.91, N: 16.94

N-(4-Nitrophenyl)guanidiniumnitrat (**43e**)

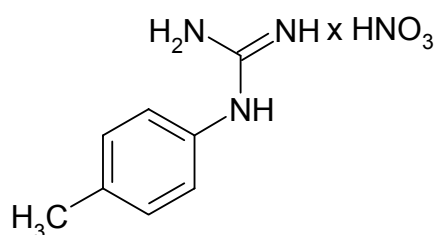


Nach AAV 5 (Methode B) aus 10 mmol (1.4 g) 4-Nitroanilin (**44e**).
Reaktionsdauer: 150 min. Umkristallisation aus 2-Propanol ergibt 462 mg (19%) rotbraune Kristalle.

Schmp.: 204-205 °C; IR (KBr): 3406 cm^{-1} , 3313 cm^{-1} , und 3196 cm^{-1} (NH (breit)), 1680 cm^{-1} (C=N), 1345 cm^{-1} (Nitrat); ^1H -NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 7.44-7.48 (m, Teil eines

AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.85 (s, 4H, NH), 8.26-8.30 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 10.18 (s, 1H, NH); C₇H₉N₅O₅ [243.18]: Ber. C: 34.57, H: 3.73, N: 28.80; Gef. C: 34.70, H: 3.81, N: 28.68

N-(4-Methylphenyl)guanidiniumnitrat (**43f**)

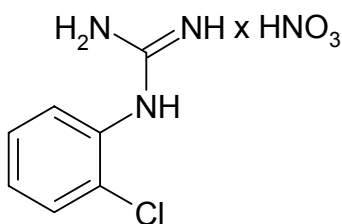


Nach AAV 5 (Methode A) aus 40 mmol (4.2 ml) p-Toluidin* (**44f**).
Reaktionsdauer: 14 h. Umkristallisation aus 2-Propanol ergibt 4.3 g (51%) beige-braune Kristalle.

Nach AAV 5 (Methode B) aus 10 mmol (1.3 ml) p-Toluidin* (**44f**).
Reaktionsdauer: 15 min. Nach zweifacher Umkristallisation aus 2-Propanol erhält man 642 mg (27%) beige-braune Kristalle.

Schmp.: 136-137 °C; IR (KBr): 3486 cm⁻¹, 3423 cm⁻¹, 3344 cm⁻¹ und 3239 cm⁻¹ (NH (breit)), 1672 cm⁻¹ (C=N), 1342 cm⁻¹ (Nitrat); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.32 (s, 3H, CH₃), 7.11-7.14 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.25-7.27 (m, 6H, NH und ArH), 9.47 (s, 1H, NH); C₈H₁₂N₄O₃ [212.21]: Ber. C: 45.28, H: 5.70, N: 26.40; Gef. C: 45.50, H: 5.73, N: 26.50

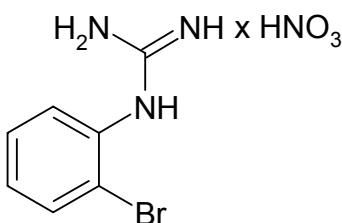
N-(2-Chlorphenyl)guanidiniumnitrat (**43g**)



Nach AAV 5 (Methode B) aus 10 mmol (1.3 g) 2-Chloranilin (**44g**).
Reaktionsdauer: 60 min. Nach zweifacher Umkristallisation aus 2-Propanol erhält man 422 mg (18%) violettfarbene Kristalle.

Schmp.: 151-152 °C (Lit.¹⁴³: 193 °C); IR (KBr): 3422 cm⁻¹ (NH), 3339 cm⁻¹ und 3180 cm⁻¹ (NH; (breit)), 1671 cm⁻¹ (C=N), 1385 cm⁻¹ (Nitrat); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 7.32-7.45 (m, 7H, NH und ArH), 7.60-7.64 (m, 1H, ArH), 9.47 (s, 1H, NH); C₇H₉ClN₄O₃ [232.62]: Ber. C: 36.14, H: 3.90, N: 24.08; Gef. C: 36.26, H: 3.90, N: 24.10

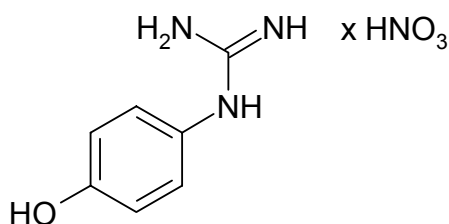
N-(2-Bromphenyl)guanidiniumnitrat (**43h**)



Nach AAV 5 (Methode B) aus 10 mmol (1.8 g) 2-Bromanilin (**44h**).
Reaktionsdauer: 15 min. Nach Umkristallisation aus 1-Butanol erhält man 567 mg (20%) violettfarbene Kristalle.

Schmp.: 148-150 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3493 cm⁻¹ (NH), 3262 cm⁻¹ und 3176 cm⁻¹ (NH (breit)), 1695 cm⁻¹ (C=N), 1386 cm⁻¹ (Nitrat); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 7.33-7.37 (m, 5H, NH und ArH), 7.43-7.51 (m, 2H, ArH) 7.45 (dd, 1H, *J* = 8.1/1.3 Hz, ArH), 9.50 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 128.7, 129.4, 129.5, 133.0 (tert. C); 121.9, 156.0 (quart. C, ein C nicht detektiert bei 288 Scans; liegt vermutlich mit unter dem Signal bei 133.0 ppm, da es im Vergleich zum DEPT-Spektrum zu einer Signalvergrößerung gekommen ist); C₇H₉BrN₄O₃ [277.08]: Ber. C: 30.34, H: 3.24, N: 20.22; Gef. C: 30.18, H: 3.33, N: 19.92

N-(4-Hydroxyphenyl)guanidiniumnitrat (**43i**)

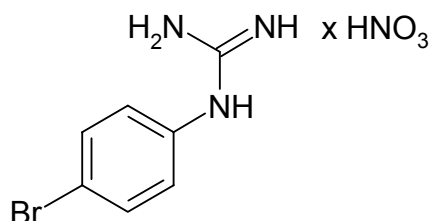


Nach AAV 5 (Methode A) aus 40 mmol (4.4 g) 4-Aminophenol (**44i**).
Reaktionsdauer: 14 h. Nach Umkristallisation aus 2-Propanol erhält man 3.3 g (38%) rosafarbene Kristalle.

Nach AAV 5 (Methode B) aus 10 mmol (1.1 g) 4-Aminophenol (**44i**).
Reaktionsdauer: 45 min. Umkristallisation aus 2-Propanol ergibt 966 mg (45%) violettfarbene Kristalle.

Schmp.: 201 °C; IR (KBr): 3412 cm⁻¹, 3269 cm⁻¹, 3184 cm⁻¹ (NH (breit); OH überdeckt), 1674 cm⁻¹ (C=N), 1384 cm⁻¹ (Nitrat); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 6.79-6.83 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.03-7.07 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.12 (s, 4H, NH), 9.23 (s, 1H, OH), 9.68 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 116.4 (2C), 127.5 (2C) (tert. C), 125.6, 156.3, 156.6 (quart. C); C₇H₁₀N₄O₄ [214.18]: Ber. C: 39.25, H: 4.71, N: 26.16; Gef. C: 39.06, H: 4.76, N: 26.01

N-(4-Bromphenyl)guanidiniumnitrat (**43k**)

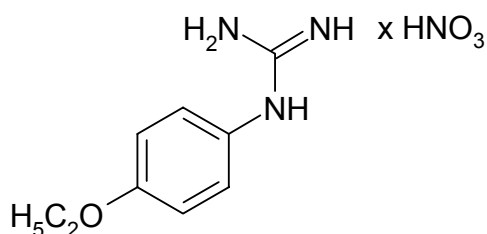


Nach AAV 5 (Methode A) aus 40 mmol (6.9 g) 4-Bromanilin (**44k**).
Reaktionsdauer: 18 h. Umkristallisation aus 2-Propanol ergibt 5.8 g (52%) beigefarbene Kristalle.

Schmp.: 185 °C; IR (KBr): 3445 cm⁻¹, 3399 cm⁻¹, 3150 cm⁻¹ (NH (breit)), 1686 cm⁻¹ (C=N), 1349 cm⁻¹ (Nitrat); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 7.19-7.23 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H,

ArH), 7.44 (s, 4H, NH), 7.61-7.64 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 9.64 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 126.8 (2C), 132.5 (2C) (tert. C); 119.0, 134.8, 155.7 (quart. C); $\text{C}_7\text{H}_9\text{BrN}_4\text{O}_3$ [277.08]: Ber. C: 30.34, H: 3.27, N: 20.22; Gef. C: 30.60, H: 3.32, N: 19.91

N-(4-Ethoxyphenyl)guanidiniumnitrat (**43l**)



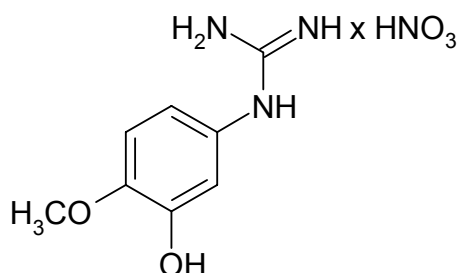
Nach AAV 5 (Methode A) aus 40 mmol (5.3 ml) p-Phenetidin (**44l**).
Reaktionsdauer: 16 h. Nach Umkristallisation aus 2-Propanol erhält man 7.2 g (74%) beigefarbene Kristalle.

Nach AAV 5 (Methode B) aus 10 mmol (1.3 ml) p-Phenetidin (**44l**).
Reaktionsdauer: 45 min. Umkristallisation aus 2-Propanol ergibt 1.9 g (79%) braune Kristalle.

Schmp.: 167 °C; IR (KBr): 3401 cm^{-1} , 3168 cm^{-1} (NH (breit)), 2996 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1681 cm^{-1} (C=N), 1386 cm^{-1} (Nitrat); ^1H -NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 1.33 (t, 3H, J = 7.0 Hz, CH_3), 4.03 (q, 2H, J = 7.0 Hz, CH_2), 6.96-7.00 (m, Teil eines AA'XX'-Systems, 2H, ArH), 7.14-7.17 (m, 6H, NH und ArH), 9.35 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 14.6 (CH_3), 63.3 (CH_2),

115.3 (2C), 127.2 (2C) (tert. C), 127.3, 156.2, 157.4 (quart. C); $C_9H_{14}N_4O_4$ [242.23]; Ber. C: 44.63, H: 5.83, N: 23.13; Gef. C: 44.60, H: 5.84, N: 23.38

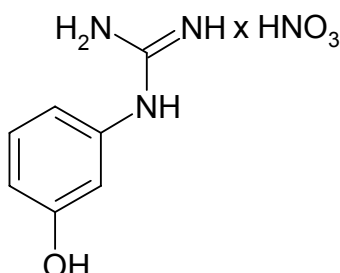
N-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)guanidiniumnitrat (**43m**)



Nach AAV 5 (Methode A) aus 40 mmol (5.6 g) 5-Amino-2-methoxyphenol (**44m**). Reaktionsdauer: 9 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 6.0 g (61%) braune Kristalle.

Schmp.: 197 °C; IR (KBr): 3438 cm^{-1} , 3397 cm^{-1} , 3338 cm^{-1} , 3269 cm^{-1} und 3209 cm^{-1} (NH (breit); OH überdeckt), 1668 cm^{-1} (C=N), 1383 cm^{-1} (Nitrat); 1H -NMR ($[D_6]$ DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3.77 (s, 3H, OCH₃), 6.63 und 6.65 (dd, 1H, J = 8.3/2.5 Hz, ArH und d, 1H, J = 2.3 Hz, ArH, Überlagerung), 6.96 (d, 1H, J = 8.3 Hz, ArH), 7.16 (s, 4H, NH), 9.30 und 9.35 (s, 1H, OH und s, 1H, NH, Überlagerung); ^{13}C -NMR ($[D_6]$ DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 55.8 (OCH₃); 112.7, 113.1, 116.2 (tert. C); 127.6, 146.8, 147.2, 156.1 (quart. C); $C_8H_{12}N_4O_5$ [244.20]: Ber. C: 39.35, H: 4.95, N: 22.94; Gef. C: 39.66, H: 5.15, N: 22.58

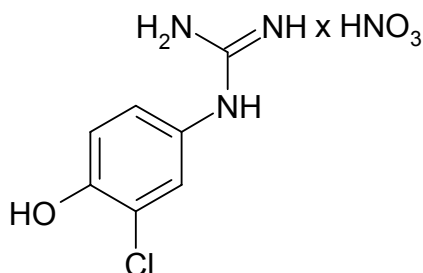
N-(3-Hydroxyphenyl)guanidiniumnitrat (**43n**)



Nach AAV 5 (Methode A) aus 40 mmol (4.4 g) 3-Aminophenol (**44n**).
Reaktionsdauer: 18 h. Umkristallisation aus 2-Propanol ergibt 326 mg (4%) braune Kristalle.

Schmp.: 132-133 °C; IR (KBr): 3445 cm⁻¹ (NH), 3328 cm⁻¹ und 3191 cm⁻¹ (NH (breit); OH überdeckt), 1685 cm⁻¹ (C=N), 1385 cm⁻¹ (Nitrat); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 6.61-6.70 (m, 3H, ArH), 7.22 („t“, 1H, *J* = 8.1/7.8 Hz, ArH), 7.31 (s, 4H, NH), 9.51 (s, 1H, OH), 9.75 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 111.2, 113.6, 114.7, 130.4 (tert. C); 136.2, 155.6, 158.3 (quart. C); C₇H₁₀N₄O₄ [214.18]: Ber. C: 39.25, H: 4.71, N: 26.16; Gef. C: 39.30, H: 4.91, N: 25.71

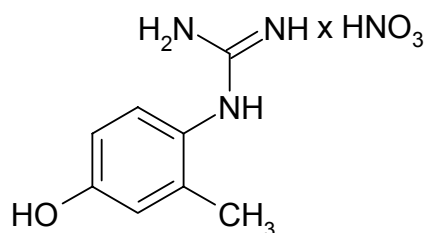
N-(4-Hydroxy-3-chlorophenyl)guanidiniumnitrat (**43o**)



Nach AAV 5 (Methode A) aus 30 mmol (4.3 g) 4-Amino-2-chlorphenol (**44o**). Reaktionsdauer: 12 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 3.4 g (45%) violettfarbene Kristalle.

Schmp.: 223 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3424 cm^{-1} (NH), 3341 cm^{-1} , 3262 cm^{-1} und 3190 cm^{-1} (NH (breit); OH überdeckt), 1679 cm^{-1} (C=N), 1384 cm^{-1} (Nitrat); ^1H -NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 7.00 (d, 1H, J = 8.6 Hz, ArH), 7.04 (dd, 1H, J = 8.6/2.3 Hz, ArH), 7.24 und 7.26 (s, 4H, NH und d, 1H, J = 2.3 Hz, ArH, Überlagerung), 9.33 (s, 1H, OH), 10.44 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 117.1, 126.2, 127.8 (tert. C); 119.9, 126.5, 152.4, 156.3 (quart. C); $\text{C}_7\text{H}_9\text{ClN}_4\text{O}_4$ [248.62]: Ber. C: 33.82, H: 3.65, N: 22.53; Gef. C: 34.16, H: 3.80, N: 22.19

N-(4-Hydroxy-2-methylphenyl)guanidiniumnitrat (**43p**)

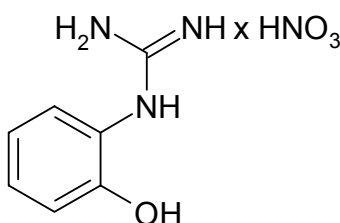


Nach AAV 5 (Methode A) aus 40 mmol (4.9 g) 4-Hydroxy-2-methylanilin (**44p**). Reaktionsdauer: 12 h. Umkristallisation aus Ethanol ergibt 1.6 g (18%) braune Kristalle.

Schmp.: 175 °C; IR (KBr): 3424 cm^{-1} (NH), 3393 cm^{-1} , 3346 cm^{-1} und 3222 cm^{-1} (NH (breit); OH überdeckt), 3037 cm^{-1} (CH

aromatisch), 1675 cm^{-1} (C=N), 1359 cm^{-1} (Nitrat); $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 2.10 (s, 3H, CH_3), 6.65 (dd, 1H, $J = 8.3/2.5\text{ Hz}$, ArH), 6.72 (d, 1H, $J = 2.5\text{ Hz}$, ArH), 6.98 (d, 1H, $J = 8.3\text{ Hz}$, ArH), 7.06 (s, 4H, NH), 8.95 (s, 1H, OH), 9.61 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 17.3 (CH_3); 113.8, 117.4, 129.3 (tert. C); 124.0, 136.9, 156.6, 157.2 (quart. C); $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_4$ [228.21]: Ber. C: 42.10, H: 5.30, N: 24.55; Gef. C: 42.22, H: 5.40, N: 24.30

***N*-(2-Hydroxyphenyl)guanidiniumnitrat (43q)**

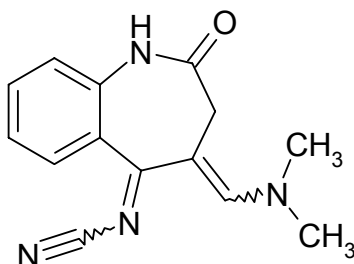


Nach AAV 5 (Methode A) aus 40 mmol (4.4 g) 2-Aminophenol (**44q**). Reaktionsdauer: 18 h. Dreifache Umkristallisation aus 2-Propanol ergibt 585 mg (7%) rote Kristalle.

Schmp.: $164\text{ }^\circ\text{C}$; IR (KBr): 3466 cm^{-1} (NH), 3373 cm^{-1} und 3156 cm^{-1} (NH (breit); OH überdeckt), 1673 cm^{-1} (C=N), 1384 cm^{-1} (Nitrat); $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 6.86 („dt“, 1H, $J = 7.8/7.6/1.3\text{ Hz}$, ArH), 6.97 (dd, 1H, $J = 8.1/1.3\text{ Hz}$, ArH), 7.14-7.20 (m, 6H, NH und ArH), 9.01 (s, 1H, OH), 10.09 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 116.6, 119.6, 127.6, 128.7 (tert. C); 121.7,

152.4, 156.3 (quart. C); C₇H₁₀N₄O₄ [214.18]: Ber. C: 39.25, H: 4.71, N: 26.16; Gef. C: 39.53, H: 4.69, N: 25.93

4-[(Dimethylamino)methyliden]-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-5H-[1]benzazepin-5-ylidencyanamid (**47**)



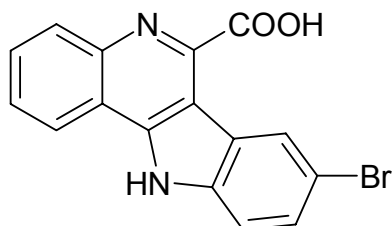
Methode A: 1 mmol (230 mg) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**), 1.2 mmol (147 mg) 1H-Pyrazol-1-carboxamidin-Hydrochlorid (**45**) und 1.2 mmol (48 mg) Natriumhydroxid werden in 5 ml 2-Propanol in einem geschlossenen Reaktionsgefäß bei 180 °C für 30 Minuten in der Synthesemikrowelle (150 Watt, Maximaldruck: 280 Psi) gerührt. Der Ansatz wird auf Kieselgel 60 einrotiert und anschließend säulenchromatographisch über Kieselgel 60 (FM: Ethylacetat) gereinigt. Nach Einengen der vereinigten Ethylacetatphasen erhält man 58 mg (11%) farblose Kristalle.

Methode B: 2 mmol (464 mg) 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-[1]benzazepin-2,5-dion (**18**) und 4 mmol (214 mg) Cyanamid werden in 5 ml 2-Propanol in einem geschlossenen Reaktionsgefäß bei 180 °C für 60 Minuten in der Synthesemikrowelle (150 Watt, Maximaldruck: 280 Psi) gerührt. Der erhaltene

Niederschlag wird abgesaugt und verworfen. Anschließend setzt man Wasser zu und saugt den neuen Niederschlag ebenfalls ab. Umkristallisation des zweiten Niederschlags aus Ethanol ergibt 65 mg (13%) farblose Kristalle.

Schmp.: 265-266 °C; IR (KBr): 3192 cm^{-1} (NH), 3059 cm^{-1} (CH aromatisch), 2918 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1686 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz): $\delta(\text{ppm}) = 3.17$ (s, 6H, CH_3), 3.27 (s, 2H, CH_2), 7.19 (dd, 1H, $J = 8.1/1.3$ Hz, ArH), 7.29 („dt“, 1H, $J = 7.3/7.8/1.3$ Hz, ArH), 7.51 („dt“, 1H, $J = 8.1/7.3/1.5$ Hz, ArH), 8.04 (dd, 1H, $J = 7.8/1.5$ Hz, ArH), 8.34 (s, 1H, =CH), 10.12 (s, 1H, NH); ^{13}C -NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 36.7 (2C) (CH_3); 36.0 (CH_2); 121.9, 123.8, 129.8, 130.8, 157.1 (tert. C); 114.3, 129.2, 137.9, 160.2, 161.5, 171.8 (quart. C); $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}$ [254.29]: Ber. C: 66.13, H: 5.55, N: 22.03; Gef. C: 66.10, H: 5.56, N: 21.71; HPLC: t_s : 3.90 min; Reinheit: 99.3%/98.0% [ACN:H₂O (40:60); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; $t_m(\text{DMSO})$: 1.03 min; 100%-Methode]; MS (EI): m/z (%). 225 (100), 254 (80) $[\text{M}]^+$; cLogP: 3.14 ± 0.63

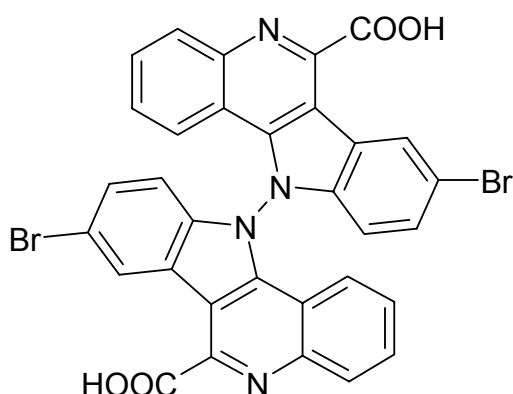
8-Brom-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**65**)



0.7 mmol (239 mg) Kenpaullon (**2a**) und 0.9 mmol (123 mg) Hydroxybenzotriazol (HOBt) werden in 10 ml DMF für etwa 50 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit 50 ml Wasser und etwas Petroläther gewaschen. Trocknen unter Vakuum ergibt 122 mg (49%) gelbes Pulver.

Schmp.: 378 °C (Lit.²⁹: > 330°C)

N,N'-Bis-(8-Brom-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure) (**68**)

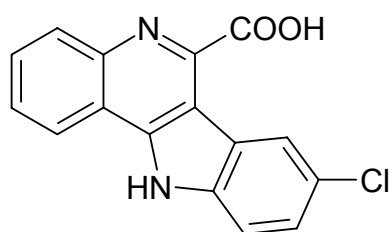


0.3 mmol (102 mg) 8-Brom-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**65**) werden in 15 ml DMSO gelöst und eisgekühlt. Zu dieser Lösung wird langsam ein Gemisch aus 2 ml Eisessig und 2 ml conc. Salpetersäure zugetropft. Anschließend wird für 4 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser und Petroläther gewaschen. Nach Aufkochen in 50 ml Ethanol erhält man 65 mg (64%) gelbes Pulver.

Schmp.: ab 325 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3100 cm⁻¹-2660 cm⁻¹ (sehr breite Bande; CH aromatisch und CH aliphatisch, OH

(Carbonsäure) überdeckt), 1630 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO+TFA, 400 MHz): $\delta(\text{ppm}) = 7.81$ und 7.84 (d und dd, 4H, $J = 8.3$ Hz, ArH und $J = 8.6/1.8$ Hz, ArH, Überlagerung), 8.04 („dt“, 2H, $J = 7.3/8.1/0.8$ Hz, ArH), 8.13 („dt“, 2H, $J = 8.3/7.3/1.3$ Hz, ArH), 8.67 („d“, 2H, $J = 8.6$ Hz, ArH), 8.76 („d“, 2H, $J = 7.8$ Hz, ArH), 9.02 (d, 2H, $J = 1.3$ Hz, ArH), 14.37 (s, 2H, COOH); $^{13}\text{C-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO+TFA, 100.6 MHz): δ (ppm) = 115.0 (2C), 122.2 (2C), 123.3 (2C), 127.9 (2C), 129.5 (2C), 131.3 (2C), 133.2 (2C) (tert. C); 112.0 (2C), 115.6 (2C), 116.1 (2C), 122.9 (2C), 135.5 (2C), 139.9 (2C), 140.0 (2C), 146.7 (2C), 162.3 (2C) (quart. C); $\text{C}_{32}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{N}_4\text{O}_4$ [680.30]; HPLC: t_s : 3.22 min; Reinheit: 99.9%/99.6% [ACN:H₂O/TFA (25:75); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m (DMSO): 1.03 min; 100%-Methode]; MS (EI): m/z (%) 296 (100), 217 (55), (ESI-neg.): m/z (%) 295 (100), 703 (80)

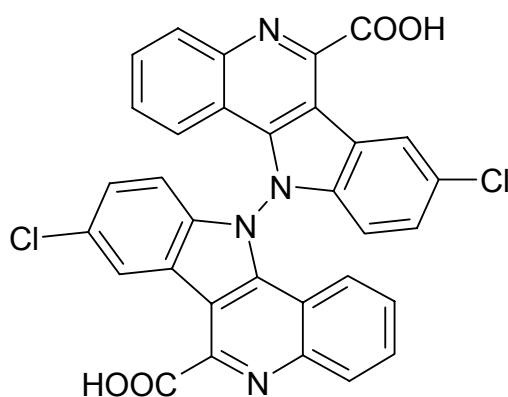
8-Chlor-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**70**)



1 mmol (285 mg) 9-Chlorpaullon (**2e**) und 2.5 mmol (338 mg) Hydroxybenzotriazol (HOBt) werden in 14 ml DMF für etwa 50 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit 70 ml Wasser und etwas Petroläther gewaschen. Umkristallisation aus DMF ergibt 159 mg (53%) gelbes Pulver.

Schmp.: 373 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3208 cm⁻¹ (NH), 3055 cm⁻¹ (CH aromatisch), 2977 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1621 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ(ppm) = 7.38-7.45 (m, 2H, ArH), 7.57-7.64 (m, 3H, ArH), 8.20 („d“, 1H, *J* = 7.8 Hz, ArH), 8.32 („s“, 1H, ArH), 11.55 (s, 1H, NH), 12.83 (s, 1H, COOH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 100.6 MHz): δ (ppm) = 113.4, 121.0, 121.5, 123.7, 125.2, 127.0, 131.3 (tert. C); 113.5, 116.6, 127.1, 128.1, 135.6, 135.7, 142.6, 161.0, 175.0 (quart. C); C₁₆H₉ClN₂O₂ [296.71]: Ber. C: 64.77, H: 3.06, N: 9.44; Gef. C: 64.48, H: 2.94, N: 9.33; HPLC: t_s: 2.97 min; Reinheit: 99.3%/99.6% [ACN:H₂O/TFA (35:65); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; t_m(DMSO): 1.04 min; 100%-Methode]; MS (EI): m/z (%) 268 (100), 296 (30) [M]⁺, (ESI-neg.): m/z (%) 295 (100) [M]⁺; cLogP: 4.35 ± 1.05

N,N'-Bis-(8-Chlor-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure) (71)



0.3 mmol (95 mg) 8-Chlor-11*H*-indolo[3,2-*c*]chinolin-6-carbonsäure (**70**) werden in 15 ml DMSO gelöst und eisgekühlt. Zu dieser Lösung wird langsam ein Gemisch aus 3 ml Eisessig und 3 ml conc. Salpetersäure zugetropft. Anschließend wird für 6 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser und Petroläther gewaschen. Trocknen unter Vakuum ergibt 87 mg (92%) gelbes Pulver.

Schmp.: ab 310 °C (unter Zersetzung); IR (KBr): 3111-2955 cm⁻¹ (sehr breite Bande; CH aromatisch und CH aliphatisch, COOH überdeckt), 1633 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR ([D₆]DMSO+TFA, 400 MHz): δ(ppm) = 7.76 (dd, 2H, *J* = 8.6/2.3 Hz, ArH); 7.90 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz, ArH), 8.06 („dt“, 2H, *J* = 8.3/8.1/1.0 Hz, ArH), 8.15 („dt“, 2H, *J* = 8.3/8.6/1.5 Hz, ArH), 8.69 („d“, 2H, *J* = 8.3 Hz, ArH), 8.79 (dd, 2H, *J* = 8.3/0.8 Hz, ArH), 8.90 (d, 2H, *J* = 2.0 Hz, ArH), 14.42 (s, 2H, COOH); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO+TFA, 100.6 MHz): δ (ppm) = 114.9 (2C), 122.3 (2C), 123.6 (2C), 125.2 (2C), 129.0 (2C), 129.7 (2C), 133.5 (2C) (tert. C); 112.5 (2C), 116.4 (2C), 122.6 (2C), 128.1 (2C), 135.6 (2C), 139.9 (2C), 140.0 (2C), 147.3 (2C), 162.5 (2C) (quart. C); C₃₂H₁₆Cl₂N₄O₄ [591.40]; HPLC: *t*_s: 2.44 min; Reinheit: 100.0%/100.0% [ACN:H₂O/TFA (25:75); 15 min; Flussrate: 1.000 ml/min; 254/280 nm; *t*_m(DMSO): 1.03 min; 100%-Methode]; MS (EI): *m/z* (%) 252 (100), 217 (20), (ESI-neg.): *m/z* (%) 295 (100), 591 (10)

Anhang zu Kapitel 8.2

Im Umgang mit folgenden Chemikalien sind besondere Gefahren zu beachten:

Phenylhydrazin: T Giftig, N Umweltgefährdend

R 45-23/24/25-36/38-43-48/23/24/25-50-68: Kann Krebs erzeugen - Giftig beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut - Reizt die Augen und die Haut - Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich - Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken - Sehr giftig für Wasserorganismen - Irreversibler Schaden möglich

S 53-45-61: Exposition vermeiden – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett zeigen) - Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisung einholen/ Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen

Anilin und seine Derivate: T(+) (Sehr) Giftig, N Umweltgefährdend

R 45-23/24/25 bzw. 26/27/28-33-36-40-41-43-48/23/24/25-50/53-68: Kann Krebs erzeugen - (Sehr) Giftig beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut - Gefahr kumulativer Wirkungen - Reizt die Augen - Verdacht auf krebserzeugende Wirkung - Gefahr ernster Augenschäden - Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich - Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und Verschlucken - Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkung haben - Irreversibler Schaden möglich

S 1-26-27-36/37/39-45-46-61-63: Unter Verschluss aufbewahren - Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen - Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen - Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/ Gesichtsschutz tragen - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett zeigen) - Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen - Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisung einholen/ Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen - Bei Unfall durch Einatmen: Verunfallten an die frische Luft bringen und ruhigstellen

Kaliumhydrid (KH): F Leichtentzündlich, C Ätzend

R 11-14/ 15-34: Leichtentzündlich - Reagiert heftig mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase - Verursacht Verätzungen

S 16-26-27-36/37/39-45: Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen - Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren - Beschmutzte getränkte Kleidung sofort ausziehen - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen)

Darüber hinaus müssen auch alle anderen, im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Gefahrstoffe unter Beachtung der einschlägigen Gefahrenhinweise und Sicherheitsregeln gehandhabt werden.

8.3 Biologische Daten

8.3.1 Malatdehydrogenase-Testung

8.3.1.1 Vorbereitung der Proben und Reagenzien

Für die Malatdehydrogenase-Testungen wurden zunächst folgende Lösungen hergestellt:

- Trizma-Puffer 100mM:
12.11 g TRIZMA[®] Base (Tris[hydroxymethyl]aminomethan) von Sigma (T-1503) werden in einem 1000 ml Messkolben in ca. 850 ml Aqua bidest. gelöst. Der pH-Wert wird mit 10% HCl auf pH 8.5 eingestellt. Anschließend wird mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt.
Die Lösung muss vor und während der Messung auf 25 °C temperiert werden.
- L-Malat-Lösung 0,5 M:
1.781 g L-Malic Acid (Disodium Salt) von Sigma (M-9138) werden zu 20 ml in Trizma Puffer gelöst.
Die Lösung muss vor und während der Messung auf 25 °C temperiert werden.

- NAD-Lösung 16 mM:
10.614 mg NAD (z.B. Fluka) werden in 1000 µl Trizma Puffer gelöst.
Die Lösung sollte vor und während der Messung auf 25 °C temperiert werden.
- MDH-Lösung 0.5% bzw. 1%:
5 µl mMDH-Lösung (Sigma: MDH (mitochondrial), 10.000 units, Lösung in 50% Glycerol; M-2634) bzw. 5 µl cMDH-Suspension (Sigma: MDH (cytosolisch), 5.000 units, Suspension in 3.2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7.0; M-7383) werden mit Trizma Puffer zu 1000 µl bzw. 500 µl verdünnt.
Die Lösung ist vor jeder Messung frisch anzusetzen und eiszukühlen!
- Stammlösung 10 mM der Testsubstanz:
1 mg der Probe wird in der entsprechenden Menge DMSO gelöst. Aus dieser Lösung sind folgende Verdünnungen mit DMSO herzustellen: 0.05; 0.10; 0.25; 0.50; 1.00 und 2.50 mM, ggf. auch 5.00 mM.

Für die Kinetikuntersuchungen wurden zusätzlich eine 0.2 mM NAD-, eine 0.25% MDH- und eine 0.1% MDH-Lösung hergestellt.

8.3.1.2 Messung

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Malatdehydrogenasen (mMDH und cMDH) sowie die Ermittlung der MDH-inhibitorischen Aktivität der im Rahmen dieser Arbeit getesteten Verbindungen wurden an den Spektralphotometern PU 8700 (Philips Scientific) und SPECORD 200 (Analytik Jena) bei 25 °C durchgeführt. Für die Messungen wurde die Hinreaktion (Malat → Oxalacetat) ausgewertet, indem die Zunahme der Absorption bei 340 nm (entstehendes $\text{NADH} + \text{H}^+$) gemessen wurde. Die Konzentration der MDH wurde so gewählt, dass in den ersten 2.5 Minuten ein linearer Zusammenhang zwischen der gemessenen Absorption und der Messzeit erhalten wird. Innerhalb der 2.5 Minuten wurden jeweils 50 Messpunkte aufgenommen. Die Messung der $\text{NADH} + \text{H}^+$ -Entstehung erfolgte für jede Einzelmessung gegen eine Blindlösung. Die Einzelmessungen wurden nach folgendem Schema durchgeführt.

	Blindprobe	Messlösung
Trizma-Puffer (µl)	790	790
Enzymlösung (µl)	0	3-10
DMSO/Probelösung (µl)	10	10
Mischen und 3 Minuten warten (Stoppuhr!).		
NAD^+ (µl)	50	50
Malat (µl)	150	150

Die Messlösungen wurden direkt in PMMA-Einmalküvetten (1.5 ml Halbmikro-Küvetten, Schichtdicke: 1 cm) angesetzt und vermessen. Nachdem die Pufferlösung (TRIZMA[®]), die MDH-Lösung und die Probelösung zusammengegeben und gemischt wurden, wurde jeweils eine Inkubationszeit von genau 3 Minuten (Stoppuhr) eingehalten. Die Reaktion wurde jeweils durch die Zugabe der Malat-Lösung gestartet und die Messlösung sofort danach vermessen. Da die Umsetzungsgeschwindigkeit als ein Maß für die enzymatische Aktivität der MDH anzusehen ist, wurde diese als Quotient aus der Steigung der bei der Messung erhaltenen Geraden und dem Verhältnis $\Delta A/\Delta t$ berechnet. Die Umsetzungsgeschwindigkeit, die sich jeweils aus der Messung ohne Zugabe eines Inhibitors ermitteln ließ, wurde als reine Enzymaktivität (Aktivität des ungehemmten Enzyms) definiert und der errechnete Wert 100% gleichgesetzt. Experimentell konnte festgestellt werden, dass eine genauere Auswertung und somit eine bessere Reproduzierbarkeit der Messergebnisse erreicht werden kann, wenn der errechnete Wert für die Umsetzungsgeschwindigkeit der reinen Enzymaktivität in einem Bereich von 55 bis 70 mAU/min lag. Bei der Bestimmung der reinen Enzymaktivität wird der Messlösung anstelle einer Probenlösung die entsprechende Menge DMSO zugesetzt. Für die Ermittlung der reinen Enzymaktivität wurden mindestens drei bis fünf Messungen pro Messzyklus durchgeführt, die über den gesamten Messzyklus verteilt vermessen wurden. Aus den errechneten Umsetzungsgeschwindigkeiten wurde ein Mittelwert gebildet, der mit 100% gleichgesetzt und somit als reine Enzymaktivität definiert wurde.

Übersichtstestungen bei einer InhibitorKonzentration

Für die Übersichtstestungen (Tabellen 8-5 und 8-6) wurde zunächst die Restaktivität der MDH bei Anwesenheit eines Inhibitors mit einer Finalkonzentration von 10 µM bestimmt. Die Ermittlung der Restaktivität fand entsprechend der Bestimmung der reinen Enzymaktivität statt. Es wurden mindestens zwei unabhängige Dreifachbestimmungen durchgeführt. Zur Aktivität des ungehemmten Enzyms ins Verhältnis gesetzt, berechnet sich die prozentuale Restaktivität nach der Gleichung:

$$\text{Restaktivität [\%]} = \frac{\Delta A / \Delta t \text{ Probe [mAU/ min]}}{\Delta A / \Delta t \text{ reine Enzymaktivität [mAU/ min]}} \cdot 100\%$$

Bestimmung der IC₅₀-Werte

Zur Bestimmung der IC₅₀-Werte wurden von sechs bis acht verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen (0.5 µM, 1.0 µM, 2.5 µM, 5.0 µM, 10.0 µM, 25.0 µM, 50.0 µM, 100.0 µM) Restaktivitäten bestimmt. Für jede Konzentration wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die ermittelten Restaktivitäten wurden graphisch gegen die entsprechende InhibitorKonzentration aufgetragen und aus dem resultierendem Graph der IC₅₀-Wert mit Hilfe des GraphPad Prism[®]-Programms berechnet.⁸⁰

Für jede Testsubstanz wurden mindestens zwei unabhängige IC₅₀-Werte ermittelt (Tabelle 8-7 bis 8-9).

Verfahren zur Bestimmung der Enzymkinetik

Zur Bestimmung der Reaktionskinetik der mMDH-Hemmung durch Paullone wurde der 9-Carbonsäurehexylester **2p** verwendet. Die Untersuchungen für die Einzelmessungen erfolgten bei fünf verschiedenen Konzentrationsniveaus von **2p** (0.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 μM) und sechs verschiedenen NAD^+ -Konzentrationen (5.0, 10.0, 20.0, 35.0, 50.0, 75.0 μM) nach folgendem Schema.

Endkonzentration NAD^+ [μM]	5	10	20	35	50	75
Trizma-Puffer [μl]	815	790	740	640	490	340
Probe in gleichbleibender Konzentration [μl] bzw. DMSO	10	10	10	10	10	10
MDH 0.25% [μl]	3-10	3-10	3-10	3-10	3-10	3-10
Mischen und 3 min warten						
NAD^+ - Lsg 0.2 mM [μl]	25	50	100	200	350	500
L-Malat [μl]	150	150	150	150	150	150

Zu jeder Einzelkonzentration NAD^+ wurde eine Blindprobe ohne Enzymlösung angesetzt, gegen die die Messlösung vermessen wurde.

Daraus ergab sich für die gesamte Kinetikuntersuchung folgendes Messschema.

Jede Probelösung wurde vermessen mit	5.0 μM NAD-Lösung
	10.0 μM NAD-Lösung
	20.0 μM NAD-Lösung
	35.0 μM NAD-Lösung
	50.0 μM NAD-Lösung
	75.0 μM NAD-Lösung

Bei jeder NAD^+ -Konzentration wurden 3 Einzelwerte ermittelt. Die Auswertung erfolgte mit dem GraphPad Prism[®]-Programm.^{90, 91}

Tabelle 8-5: Restaktivität der mMDH $\pm s_M$ [%] bei Anwesenheit verschiedener Paullone [10 μ M].

	1. Messung ^a	2. Messung ^a	3. Messung ^a	Ø Restaktivität mMDH $\pm s_M$ [%] ^b
2a	75.0	73.9	-	74.5 \pm 0.6
2b	57.2	51.1	-	54.2 \pm 3.1
2d	72.2	78.0	85.9	78.7 \pm 4.0
2e	71.8	81.5	67.0	73.4 \pm 4.3
2f	51.6	40.8	-	46.2 \pm 5.4
2g	87.4	89.1	-	88.3 \pm 0.9
2h	85.8	96.8	-	91.3 \pm 5.5
2i	80.4	95.1	-	87.8 \pm 7.4
2j	98.1	99.3	-	98.7 \pm 0.6
2k	63.9	57.8	-	60.9 \pm 3.1
2l	57.6	61.6	-	59.6 \pm 2.0
2m	41.3	36.1	-	38.7 \pm 2.6
2n	42.2	33.3	-	37.8 \pm 4.5
2o	16.9	7.2	-	12.1 \pm 4.9
2p	9.4	3.1	-	6.3 \pm 3.2
2q	6.5	3.9	-	5.2 \pm 1.3
2r	75.6	77.5	-	76.6 \pm 1.0
2s	94.9	97.4	-	96.2 \pm 1.3
2t	83.9	94.1	89.8	89.3 \pm 3.0
2u	54.4	56.0	-	55.2 \pm 0.8
2v	22.3	26.0	14.2	20.8 \pm 3.5
2w	26.1	21.0	-	23.6 \pm 2.6
2aa	96.8	98.5	-	97.7 \pm 0.9
2bb	85.3	82.5	-	83.9 \pm 1.4
2cc	58.8	53.7	-	56.3 \pm 2.6
2dd	64.8	55.8	55.6	58.7 \pm 3.0

Tabelle 8-5: Restaktivität der mMDH $\pm s_M$ [%] bei Anwesenheit verschiedener Paullone [10 μ M] - Fortsetzung.

	1. Messung ^a	2. Messung ^a	3. Messung ^a	Ø Restaktivität mMDH $\pm s_M$ [%] ^b
2ee	29.9	12.6	2.6	15.0 \pm 8.0
2ff	82.0	81.9	-	82.0 \pm 0.1
2gg	32.7	19.1	25.8	25.9 \pm 3.9
2hh	91.8	86.5	-	89.2 \pm 2.7
2ii	90.7	84.5	-	87.6 \pm 3.1
2jj	59.1	68.0	68.8	65.3 \pm 3.1
2kk	24.6	34.5	27.1	28.7 \pm 3.0
48a	8.0	9.2	-	8.6 \pm 0.6
48b	81.3	82.4	-	81.9 \pm 0.6
48c	74.1	74.1	-	74.1 \pm 0.0
48d	99.0	96.9	-	98.0 \pm 1.1
49	74.3	76.7	-	75.5 \pm 1.2
50	47.7	53.4	-	50.6 \pm 2.9
51	96.2	95.9	-	96.1 \pm 0.2

^a Die Messungen erfolgten am PU 8700 Series Spektralphotometer. Die angegebenen Werte resultierten aus den Mittelwerten einer durchgeführten Dreifachbestimmung.

^b $s_M = SEM = s/\sqrt{N}$ (SEM, engl.: Standard Error of the Mean; Standardfehler des Mittelwerts).⁷⁹

Tabelle 8-6: Restaktivität der mMDH $\pm s_M$ [%] bei Anwesenheit der Paullon-Strukturanaloga **8** und **9** [10 μ M].

	1. Messung ^a	2. Messung ^a	Ø Restaktivität mMDH $\pm s_M$ [%] ^b
8a	102.3	101.7	102.0 \pm 0.3
8b	107.2	97.4	105.7 \pm 4.9
8c	102.8	100.0	101.4 \pm 1.4
8d	102.6	102.4	102.5 \pm 0.1
8e	100.5	105.2	102.7 \pm 2.4
8f	95.1	104.6	99.6 \pm 4.8
8g	97.1	100.7	98.7 \pm 1.8
8h	101.4	100.7	101.1 \pm 0.4
8i	95.7	98.5	97.1 \pm 1.4
8j	97.6	104.9	101.3 \pm 3.7
8k	100.9	101.6	101.3 \pm 0.4
8l	98.6	99.8	99.2 \pm 0.6
8m	90.6	98.3	94.5 \pm 3.9
8n	98.3	96.4	97.4 \pm 1.0
8o	98.9	98.8	98.9 \pm 0.1
8p	103.4	107.7	105.4 \pm 2.2
9a	105.2	98.6	101.9 \pm 3.3
9b	98.8	101.2	100.0 \pm 1.2
9c	91.7	89.5	90.6 \pm 1.1
9d	100.6	101.1	100.9 \pm 0.3
9e	56.9	54.9	55.9 \pm 1.0
9f	93.7	99.3	96.5 \pm 2.8
9g	96.2	96.2	96.2 \pm 0.0
9h	84.0	91.8	87.9 \pm 3.9
9i	101.8	99.6	100.7 \pm 1.1
9j	99.8	97.9	98.9 \pm 1.0

^a Die Messungen erfolgten am SPECORD 200. Die angegebenen Werte resultierten aus den Mittelwerten einer durchgeführten Dreifachbestimmung.

^b $s_M = SEM = s/\sqrt{N}$ (SEM, engl.: Standard Error of the Mean; Standardfehler des Mittelwerts).⁷⁹

Tabelle 8-7: mMDH-inhibitorische Aktivität 9-substituierter Paullone, IC₅₀-Werte ± s_M [μM] – PU 8700.^{a, b}

	1. Messung ^a	2. Messung ^a	3. Messung ^a	Ø IC ₅₀ mMDH ± s _M [μM] ^b
2q	2.1	2.1	-	2.1 ± 0.0
2p	3.7	1.4	2.7	2.6 ± 0.7
2o	3.0	2.9	-	3.0 ± 0.1
2b	5.0	5.1	-	5.1 ± 0.1
2m	4.6	5.3	-	5.0 ± 0.4
2n	5.7	6.7	-	6.2 ± 0.5
2k	6.4	6.5	-	6.5 ± 0.1
2l	8.7	7.3	-	8.0 ± 0.7
2a	15.2	13.6	-	14.4 ± 0.8
2r	18.4	17.6	-	18.0 ± 0.4
2g	27.5	25.7	-	26.6 ± 0.9

^a Die IC₅₀-Werte wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism[®] Version 4.00 errechnet.⁸⁰

^b s_M = SEM = s/√N (SEM, engl.: Standard Error of the Mean; Standardfehler des Mittelwerts).⁷⁹

Tabelle 8-8: mMDH-inhibitorische Aktivität 9-substituierter Paullone, IC₅₀-Werte ± s_M [μM] – SPECORD 200.^{a, b}

	1. Messung ^a	2. Messung ^a	3. Messung ^a	Ø IC ₅₀ mMDH ± s _M [μM] ^b
2q	3.1	2.5	2.4	2.7 ± 0.2
2p	4.5	4.0	-	4.3 ± 0.2
2o	5.0	3.8	-	4.4 ± 0.6
2b	5.1	5.7	-	5.4 ± 0.3
2m	6.3	6.0	-	6.2 ± 0.2
2n	10.2	9.6	-	9.9 ± 0.3
2k	15.0	11.6	-	13.5 ± 2.0
2l	20.8	19.2	-	20.0 ± 0.8
2a	21.8	19.3	-	20.6 ± 1.2
2f	23.0	20.7	-	21.8 ± 1.2
2d	30.0	23.2	-	26.6 ± 3.4
2e	41.5	37.5	-	39.5 ± 2.0
2r	41.1	41.5	-	41.3 ± 0.2
2g	44.7	47.5	-	46.1 ± 1.4

^a Die IC₅₀-Werte wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism® Version 4.00 errechnet.⁸⁰

^b s_M = SEM = s/√N (SEM, engl.: Standard Error of the Mean; Standardfehler des Mittelwerts).⁷⁹

Tabelle 8-9: cMDH-inhibitorische Aktivität 9-substituierter Paullone, IC₅₀-Werte ± s_M [µM] – SPECORD 200.^{a, b}

	1. Messung ^a	2. Messung ^a	Ø IC ₅₀ cMDH ± s _M [µM] ^b
2q	7.1	6.5	6.8 ± 0.3
2p	13.0	11.2	12.1 ± 0.9
2o	12.5	12.5	12.5 ± 0.0
2b	15.9	14.9	15.4 ± 0.5
2m	17.5	20.8	19.2 ± 1.7
2n	15.5	-	15.5
2k	30.3	30.3	30.3 ± 0.0
2l	>> 100	>> 100	>> 100
2a	26.9	28.0	27.5 ± 0.6
2f	>> 100	>> 100	>> 100
2d	>> 100	>> 100	>> 100
2e	>> 100	>> 100	>> 100
2r	67.6	69.2	68.4 ± 0.8
2g	>> 100	>> 100	>> 100

^a Die IC₅₀-Werte wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism[®] Version 4.00 errechnet.⁸⁰

^b s_M = SEM = s/√N (SEM, engl.: Standard Error of the Mean; Standardfehler des Mittelwerts).⁷⁹

Berechnung des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM):

Der Standardfehler des Mittelwertes s_M (SEM) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$s_M = \frac{s}{\sqrt{N}}$$

mit: s : Standardabweichung; N : Anzahl der Messungen

Die Standardabweichung wurde nach der Formel:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

mit: x_i : Einzelwert, \bar{x} : Mittelwert, n : Anzahl der Messungen,
 s : Standardabweichung

berechnet.

Da sich die Anzahl der Messungen auf zwei bzw. drei Messungen beschränkt, ist die Aussagekraft des SEM gering. Der SEM-Wert gibt lediglich einen Überblick über die Streuung innerhalb einer Messreihe, z. B. ob die einzelnen Werte einer Messreihe stark voneinander abweichen oder nicht.

8.3.2 In vitro Tumorzelllinien-Testung des NCI

Die Testung der in vitro Antitumoraktivität der 1-Aryl-4,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*][1]benzazepin-5(1*H*)-one (**8**) erfolgte am NCI (National Cancer Institute, Bethesda, USA).⁹²⁻⁹⁷ Das in vitro Antitumorscreening unterteilte sich in ein High-Throughput Prescreening und ein 60 Cell Line Screening. In dem High-Throughput Prescreening wurde eine Vorauswahl geeigneter Substanzen für das 60 Cell Line Screening getroffen.

High-Throughput Prescreening

Das High-Throughput Prescreening wurde an drei Tumorzelllinien [MCF7 (Brustkrebs), NCI-H460 (Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, NSCLC), SF-268 (ZNS)] durchgeführt. Hierzu wurden die Kavitäten von Mikrotiterplatten mit den drei Zelllinien beimpft und vorinkubiert. Nach Zugabe der Testsubstanzen (100 µM) wurden die Kulturen 48 h inkubiert. Die Endpunktbestimmung erfolgte durch den Farbstoff AlamarBlue.¹⁴⁴ Das Testergebnis jeder Substanz wird als prozentuales Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen angegeben. Das Wachstum der Kontrollzellen entspricht einem Wachstum von 100%. Werte oberhalb von 100% zeigen eine Wachstumsinduktion, ein Wert zwischen 0% und 100% eine Wachstumshemmung und negative Werte das Abtöten von Zellen an. Testsubstanzen, die das Zellwachstum auf mindestens 32% bei einer der Zelllinien reduzierten, wurden in das 60 Cell Line Screening aufgenommen.

Die Ergebnisse des High-Throughput Prescreenings sind in Tabelle 4-11 (Kap. 4.2.1, S. 106) aufgeführt.

60 Cell Line Screening

Das Screening wurde an 60 menschlichen Tumorzelllinien, die sich von neun Gruppen verschiedener Krebsarten (Leukämie, Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, Melanom, Krebs des Zentralnervensystems sowie Darm-, Eierstock-, Nieren-, Prostata- und Brustkrebs) ableiten lassen, durchgeführt. Mikrotiterplatten wurden mit den Zelllinien beimpft und anschließend die Testsubstanzen in fünf verschiedenen Konzentrationen (10^{-8} - 10^{-4} M) zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde das Medium entfernt, die Zellen fixiert, gewaschen und mit dem Farbstoff Sulforhodamin B behandelt. Der Farbstoff bindet an basische Aminosäurereste und lässt eine spektralphotometrische Bestimmung der Zellmasse zu, die durch Vermessen des angefärbten, solubilisierten Rückstands in den Kavitäten erfolgt. Aus der Zellmasse lässt sich das prozentuale Wachstum errechnen.

Für jede Zelllinie wurden Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelt, aus denen die molaren Testsubstanzkonzentrationen, die eine 50proz. Wachstumshemmung (GI_{50}), eine totale Wachstumshemmung (TGI) und ein Absterben der Hälfte der Tumorzellen (LC_{50}) bewirken, abgeleitet wurden. Aus den dekadischen Logarithmen der Einzelwerte wurde für jeden Parameter der Mittelwert, der sog. Meangraph Midpoint (MD_MID), berechnet. Dieser Wert gibt die

durchschnittliche Aktivität der jeweiligen Testsubstanz gegenüber der Gesamtheit aller getesteten Tumorzelllinien an.

Für jede Testsubstanz wurde außerdem ein Balkendiagramm angefertigt, das für alle drei Parameter (GI_{50} , TGI, LC_{50}) die relative Empfindlichkeit der einzelnen Zelllinien gegenüber der Testsubstanz im Vergleich zum Meangraph Midpoint darstellt. Der Meangraph Midpoint bildet die zentrale Achse des Balkendiagramms. Balken, die davon ausgehend nach links zeigen, sind gleichbedeutend mit einer geringeren Empfindlichkeit der betrachteten Zelllinie, Balken, die nach rechts zeigen, deuten auf eine höhere Empfindlichkeit hin. Aus dem erhaltenen Diagramm ergibt sich für jede Testsubstanz ein charakteristisches Selektivitätsprofil.

8.3.3 Proteinkinase-Assays (ProQinase)

Die Testung der Proteinkinase-inhibitorischen Aktivität der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen erfolgte durch die Firma ProQinase (ProQinase GmbH, Freiburg). Zunächst wurden für alle Testsubstanzen Inhibitionsprofile an jeweils 24 verschiedenen Kinasen (EGF-R, EphB4, ERBB2, FAK, IGF1-R, SRC, VEGFR-2, VEGFR-3, AKT1, Aurora A, Aurora B, CDK2/cyc A, CDK4/cyc D1, CK2- α 1, PLK1, TIE2, FLT3, INS-R, MET, PDGFR- β , ARK5, PAK4 oder COT, PDK1 oder BRAF-VE und SAK) bei einer Konzentration (10 μ M) erstellt. Anschließend erfolgte eine IC₅₀-Wert-Bestimmung für die getesteten Verbindungen, die an mindestens einer der überprüften Kinasen eine Hemmung von $\geq 40\%$ (Restaktivität $\leq 60\%$) bewirkten. Die Kinaseaktivitäten wurden anhand der Phosphorylierungsaktivitäten an den entsprechenden Substraten bestimmt. Gemessen wurde die Einlagerung von radioaktiv markiertem Phosphat in die Substrate.

Alle Proteinkinasen wurden in Sf9 Insektenzellen als rekombinante GST-fusion Proteine oder His-tagged Proteine mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems exprimiert. Die Reinigung und Isolierung erfolgte durch Affinitätschromatographie an GSH-Agarose (Sigma) oder an Ni-NTH-Agarose (Qiagen). Die Reinheit und die Identität der Kinasen wurde über SDS-Page/Silberanfärbung und Western Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern überprüft. Sowohl die Bestimmungen der Restaktivitäten zur Erstellung der Inhibitionsprofile als auch die IC₅₀-Wert-Bestimmungen erfolgten anhand des ³³PanQinase[®] Activity Assays. Das Reaktionsgemisch

(Endvolumen 50 µl) wurde in vier Schritten in folgender Reihenfolge pipettiert: 20 µl Standardpuffer, 5 µl ATP-Lösung (in Wasser), 5 µl Probelösung/Inhibitor (in 10% DMSO) und 20 µl der Mischung aus 10 µl Substrat- und 10 µl Enzym-Lösung. Der Assay für jedes Enzym enthält 60 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 3 mM MgCl₂-Lösung, 3 µM Na-ortho-Vanadat, 1.2 mM DTT, 50 µg/ml PEG₂₀₀₀ und 1 µM [γ -³³P]-ATP (ca. 5×10^5 cpm per well). Insgesamt wurden neun verschiedene Substrate in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt: 125 ng/50 µl Poly(Glu,Tyr)_{4:1} für 40 ng/50 µl EGF-R, 20 ng/50 µl EphB4, 200 ng/50 µl ERBB2, 200 ng/50 µl FAK, 25 ng/50 µl IGF1-R, 10 ng/50 µl SRC, 50 ng/50 µl VEGFR-2, 100 ng/50 µl VEGFR-3, 200 ng/50 µl TIE2; 1000 ng/50 µl GSK-3 (14-27) für 100 ng/50 µl AKT1; 500 ng/50 µl tetra (LRRWSLG) für 50 ng/50 µl Aurora A, 25 ng/50 µl PAK4, 25 ng/50 µl PDK1; 250 ng/50 µl tetra (LRRWSLG) für 200 ng/50 µl Aurora B; 125 ng/50 µl Histone H1 für 100 ng/50 µl CDK2/cyc A; 500 ng/50 µl Rb-CTF für CDK4/cyc D1; 125 ng/50 µl p53-CTM für 150 ng/50 µl CK2-alpha1; 1000 ng/50 µl Casein für PLK1; 125 ng/50 µl Poly(Ala, Glu, Lys, Tyr)_{6:2:5:1} für 150 ng/50 µl FLT3, 25 ng/50 µl INS-R, 100 ng/50 µl MET, 50 ng/50 µl PDGFR- β ; 250 ng/50 µl MEK1-KM (Lot 011) für 20 ng/50 µl BRAF-VE; Autophosphorylierung bei ARK5, SAK und COT. Die Reaktionsgemische wurden bei 30 °C für 80 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 µl einer 2proz. (v/v) Phosphorsäure gestoppt und anschließend zweimal mit 200 µl einer 0.9proz. (w/v) Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die Inkorporierung von ³³P-Phosphat wurde mit einem Mikroplatten-Scintillationszähler (Microbeta Trilux, Wallac) bestimmt. Alle Assays wurden mit einem BeckmanCoulter/Sagian Roboter-System

durchgeführt. Es wurden Kontrollproben mit Substrat aber ohne Enzym vermessen („low control“), deren Messwert die unspezifische Bindung von Radioaktivität an die Mikrotiterplatten darstellt. Ebenso wurden Kontrollproben mit Enzym aber ohne Inhibitor vermessen („high control“), deren Wert der Enzymaktivität entsprechen. Die Differenz aus „high control“ und „low control“ entspricht der reinen Enzymaktivität und wurde mit 100% Aktivität gleichgesetzt. Die Restaktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Restaktivität [\%]} = \frac{\text{Messergebniss mit Testsubstanz} - \text{low control}}{\text{high control} - \text{low control}} \cdot 100\%$$

Erstellung der Inhibitionsprofile

Für jede Substanz wurde die Restaktivität an 24 unterschiedlichen Kinasen bei einer Finalkonzentration von 10 µM bestimmt. Die Ergebnisse können den Tabellen 8-10 und 8-11 entnommen werden.

Bestimmung der IC₅₀-Werte

Zur Bestimmung der IC₅₀-Werte wurden von zehn verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen (0.1 mM, 30.0 µM, 10.0 µM, 3.0 µM, 1.0 µM, 0.3 µM, 0.1 µM, 30.0 nM, 10.0 nM, 3 nM) Restaktivitäten bestimmt. Der IC₅₀-Wert wurde mit Hilfe des Programms Quattro Workflow V1.1.0.8 (Quattro Research GmbH, München) berechnet. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 8-12 und 8-13 aufgeführt.

Z'-Faktor

Der Z'-Faktor ist ein Parameter für die Assayqualität¹⁴⁵ und wurde für die Kontrollproben (low und high control) der einzelnen Mikrotiterplatten ermittelt (n = 8). Die Firma ProQinase setzt als Kriterium für die Assayqualität einen Z'-Wert von mindestens 0.40 voraus; liegt der Wert unterhalb dieser Grenze, wird der Assay wiederholt. Für die in dieser Arbeit angegebenen Messungen wurde kein Z'-Wert unterhalb von 0.43 ermittelt. In den meisten Fällen lag der Z'-Wert oberhalb von 0.60, was auf eine gute bis exzellente Assayqualität deutet.

Tabelle 8-10: Inhibitionsprofile (Restaktivitäten [%] bei 10 µM Inhibitorkonzentration) der getesteten Substanzen **8a-p** (Teil A)

	EGF-R	EphB4	ERBB2	FAK	IGF1-R	SRC	VEGFR-2	VEGFR-3	AKT1	Aurora A	Aurora B	Ins-R
8a	97	93	103	95	101	97	83	89	98	99	101	96
8b	101	96	102	89	99	92	65	66	103	88	89	94
8c	99	94	100	95	100	91	80	73	105	97	99	111
8d	107	105	111	103	107	96	107	108	110	92	101	95
8e	102	93	120	90	98	93	71	77	102	92	102	97
8f	103	96	101	90	94	93	78	70	106	94	103	107
8g	95	103	101	94	86	79	82	71	106	96	99	94
8h	102	99	102	86	89	91	71	76	102	112	117	97
8i	94	84	97	91	84	70	61	60	105	104	87	93
8j	101	106	104	102	93	84	93	88	97	103	101	106
8k	97	80	134	87	99	92	78	82	101	91	69	98
8l	99	99	97	89	95	85	78	77	106	95	108	95
8m	99	100	104	102	100	86	94	100	104	101	105	96
8n	94	100	99	95	93	95	91	80	105	101	102	101
8o	99	102	97	95	100	96	80	68	78	121	94	108
8p	101	102	96	101	101	97	91	89	103	85	99	104

Tabelle 8-10: Inhibitionsprofile (Restaktivitäten [%] bei 10 μ M InhibitorKonzentration) der getesteten Substanzen **8a-p** (Teil B)

	CDK2/cyc A	CDK4/cyc D1	CK2- α 1	PLK1	TIE2	FLT3	MET	PDGFR- β	ARK5	PAK4	PDK1	SAK
8a	97	96	108	103	97	107	100	112	94	88	120	89
8b	91	97	105	97	102	78	94	90	96	111	102	89
8c	94	103	101	98	97	51	98	89	108	103	100	94
8d	101	100	106	98	97	96	90	92	111	111	79	101
8e	98	95	100	98	93	93	91	97	105	103	104	97
8f	98	83	108	97	99	89	103	95	96	97	108	99
8g	93	114	103	98	97	95	99	95	98	88	81	115
8h	88	68	110	96	97	99	103	92	105	116	100	96
8i	105	98	103	81	100	79	84	84	94	111	85	97
8j	113	76	102	105	92	115	112	108	94	93	97	108
8k	99	41	104	93	89	78	95	95	107	103	91	97
8l	98	107	101	99	94	91	94	92	109	106	90	91
8m	98	103	102	99	95	90	101	100	98	116	100	104
8n	99	99	103	100	99	95	104	94	95	96	100	103
8o	96	82	105	103	107	109	105	106	91	89	89	105
8p	102	103	98	100	91	94	100	95	97	102	96	99

Tabelle 8-11: Inhibitionsprofile (Restaktivitäten [%] bei 10 µM InhibitorKonzentration) der getesteten Substanzen **9a-q** (Teil A)

	EGF-R	EphB4	ERBB2	FAK	IGF1-R	SRC	VEGFR-2	VEGFR-3	AKT1	Aurora A	Aurora B	CDK2/cyc A	Ins-R
9a	93	83	92	69	103	92	18	26	109	63	81	101	97
9b	91	61	98	39	100	66	10	12	93	31	65	100	97
9c	90	71	87	45	78	58	14	15	100	36	86	101	97
9d	79	60	92	38	81	67	14	10	97	25	72	92	85
9e	61	51	63	62	28	37	14	23	90	57	90	97	75
9f	88	79	91	72	70	70	25	30	101	67	97	101	96
9g	86	87	98	36	79	62	37	59	103	96	113	100	97
9h	84	81	101	51	76	68	64	68	96	84	97	98	100
9i	86	39	78	10	82	47	0	2	106	24	55	99	93
9j	92	82	98	79	102	81	39	59	104	77	96	99	99
9k	84	65	78	61	83	57	14	17	99	35	66	118	99
9l	87	53	88	53	94	50	6	11	74	40	72	84	91
9m	63	25	71	12	57	21	1	2	93	17	30	57	63
9n	58	25	59	12	58	24	1	1	93	15	32	63	68
9o	57	23	62	12	49	9	1	1	83	13	28	55	71
9p	76	73	81	20	88	41	11	10	99	73	85	89	97
9q	82	48	69	21	82	55	4	5	93	33	76	83	88

Tabelle 8-11: Inhibitionsprofile (Restaktivitäten [%] bei 10 μ M InhibitorKonzentration) der getesteten Substanzen **9a-q** (Teil B)

	CDK4/cyc D1	CK2- α 1	PLK1	TIE2	FLT3	MET	PDGFR- β	ARK5	PAK4	COT	PDK1	BRAF-VE	SAK
9a	95	106	94	70	97	100	88	89	97	n. t.	98	n. t.	109
9b	93	105	68	37	54	89	64	73	72	n. t.	67	n. t.	81
9c	98	107	89	67	91	95	87	99	59	n. t.	77	n. t.	87
9d	83	104	54	61	50	81	66	83	60	n. t.	72	n. t.	76
9e	74	87	87	45	72	85	67	78	79	n. t.	57	n. t.	87
9f	104	98	96	89	90	100	96	86	81	n. t.	88	n. t.	90
9g	98	103	71	88	97	104	99	111	102	n. t.	89	n. t.	110
9h	92	99	85	96	86	94	88	110	95	n. t.	94	n. t.	104
9i	83	91	58	19	28	95	39	31	60	n. t.	36	n. t.	63
9j	97	102	97	72	92	95	85	94	99	n. t.	93	n. t.	93
9k	101	96	76	48	87	90	90	79	n. t.	84	n. t.	106	91
9l	111	97	75	49	51	87	74	61	n. t.	86	n. t.	79	91
9m	101	97	38	2	11	82	25	20	n. t.	100	n. t.	90	37
9n	107	95	48	3	12	74	19	19	n. t.	95	n. t.	93	35
9o	110	86	44	6	8	70	21	17	n. t.	95	n. t.	74	43
9p	45	95	56	46	59	98	65	65	n. t.	89	n. t.	58	84
9q	112	88	47	11	50	90	63	53	n. t.	99	n. t.	82	82

n. t.: nicht getestet

Tabelle 8-12: IC₅₀-Werte [μ M] der getesteten Substanzen **8c**, **8k**, **8i** und **9a-g** (Teil A)^a

	<u>EGF-R</u>	<u>EPHB4</u>	<u>ERBB2</u>	<u>FAK</u>	<u>IGF1-R</u>	<u>SRC</u>	<u>VEGFR-2</u>	<u>VEGFR-3</u>	<u>AKT1</u>	<u>Aurora A</u>	<u>Aurora B</u>	<u>Ins-R</u>
8c							62	63				
8k				61			40	28				
8i		56			86	55	24	16				
9a				55			0.14	0.16		11		
9b	59	5.0		1.3	39	8.6	0.095	0.14		0.91	49	99
9c				6.4			0.19	0.21		2.1		
9d		28		4.8		32	0.40	0.42		2.4		
9e	18	12	38	26	52	4.3	0.33	0.93		22		22
9f				19	58	38	0.19	0.30				
9g				2.9		42	6.1	6.6		100		

^a IC₅₀-Werte größer als 100 μ M wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht abgebildet.

Tabelle 8-12: IC₅₀-Werte [µM] der getesteten Substanzen **8c**, **8k**, **8i** und **9a-g** (Teil B)^a

	CDK2/cyc A	CDK4/cyc D1	CK2-α1	PLK1	TIE2	FLT3	MET	PDGFR-β	ARK5	PAK4	PDK1	SAK
8c		98			98							
8k												
8i												
9a												
9b				47	1.4	7.1		15	56		49	
9c		88			65						39	
9d				15	12	39		96			27	
9e		38			4.8	44	85	28				
9f		100			33							
9g				73								

^a IC₅₀-Werte größer als 100 µM wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht abgebildet.

Tabelle 8-13: IC₅₀-Werte [µM] der getesteten Substanzen **9h-q** (Teil A)^a

	EGF-R	EphB4	ERBB2	FAK	IGF1-R	SRC	VEGFR-2	VEGFR-3	AKT1	Aurora A	Aurora B	BRAF-VE	Ins-R
9h				11			57	33					n. t.
9i		81		3.2		64	0.080	0.097		21			n. t.
9j		51				49	8.3	16		73			n. t.
9k		87		11		63	0.29	0.48		3.7	9.2		58
9l	47	6.4		3.1	45	67	0.13	0.17		2.0			
9m	18	2.8	18	0.64	15	3.0	0.073	0.089		0.72	3.0	49	24
9n	26	2.0		0.90	27	2.8	0.051	0.059		0.77	3.5		
9o	24	2.4	13	0.80	33	1.4	0.035	0.038		0.35	2.3		84
9p	38	16	47	2.5	38	5.0	1.2	0.76		39	73		
9q	60	9.6	52	2.9	86	13	0.53	0.42		5.8	40		

^a IC₅₀-Werte größer als 100 µM wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht abgebildet.

n. t.: nicht getestet

Tabelle 8-13: IC₅₀-Werte [μ M] der getesteten Substanzen **9h-q** (Teil B)^a

	CDK2/cyc A	CDK4/cyc D1	CK2- α 1	PLK1	TIE2	FLT3	MET	PDGFR- β	ARK5	PAK4	PDK1	COT	SAK
9h												n. t.	
9i		100			1.2	12		27				n. t.	
9j					33							n. t.	
9k		23			14			94		n. t.	n. t.		
9l					2.9	19			38	n. t.	n. t.		
9m	14			5.7	0.63	1.3		1.7	1.5	n. t.	n. t.		
9n	17			19	0.64	1.3		1.8	1.4	n. t.	n. t.		
9o	23	59		9.3	0.48	0.70		1.4	0.79	n. t.	n. t.		
9p				20	11	23		22	26	n. t.	n. t.		
9q				14	2.9	16		19	18	n. t.	n. t.		

^a IC₅₀-Werte größer als 100 μ M wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht abgebildet.
n. t.: nicht getestet

9 Literaturverzeichnis

1. Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M.: In: *Prinzipien der Biochemie*. Tschesche, H. (Hrsg.), 2. Aufl., **1998**, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Berlin, 527-543.
2. Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M.: In: *Prinzipien der Biochemie*. Tschesche, H. (Hrsg.), 2. Aufl., **1998**, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Berlin, 627-687.
3. Musrati, R. A., Kollarova, M., Mernik, N. and Mikulasova, D.: Malate dehydrogenase: Distribution, function and properties. *Gen. Physiol. Biophys.* **1998**, 17, 193-210.
4. Chien, S. M. and Freeman, K. B.: Import of rat liver mitochondrial malate dehydrogenase. Synthesis, transport, and processing in vitro of its precursor. *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 3337-3342.
5. Gleason, W. B., Fu, Z., Birktoft, J. J. and Banaszak, L. J.: Refined crystal structure of mitochondrial malate dehydrogenase from porcine heart and the consensus structure for dicarboxylic acid oxidoreductases. *Biochemistry* **1994**, 33, 2078-2088.
6. Birktoft, J. J., Fu, Z., Carnahan, G. E., Rhodes, G., Roderick, S. L. and Banaszak, L. J.: Comparison of the molecular structures of cytoplasmic and mitochondrial malate dehydrogenase. *Biochem. Soc. Trans.* **1989**, 17, 301-304.
7. Birktoft, J. J., Rhodes, G. and Banaszak, L. J.: Refined crystal structure of cytoplasmic malate dehydrogenase at 2.5-Å resolution. *Biochemistry* **1989**, 28, 6065-6081.

8. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. and Ferrin, T. E.: UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, 25, 1605-1612.
9. ArgusLab 4.0.1, Thompson, M. A. (mark@arguslab.com), Planaria Software LLC, Seattle, WA.
10. Birktoft, J. J. and Banaszak, L. J.: The presence of a histidine-aspartic acid pair in the active site of 2-hydroxyacid dehydrogenases. X-ray refinement of cytoplasmic malate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 472-482.
11. Roderick, S. L. and Banaszak, L. J.: The three-dimensional structure of porcine heart mitochondrial malate dehydrogenase at 3.0-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 9461-9464.
12. Joh, T., Takeshima, H., Tsuzuki, T., Setoyama, C., Shimada, K., Tanase, S., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H. and Morino, Y.: Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding mammalian cytosolic malate dehydrogenase. Comparison of the amino acid sequences of mammalian and bacterial malate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 15127-15131.
13. Baker, B. R. and Bramhall, R. R.: Irreversible enzyme inhibitors. 189. Inhibition of some dehydrogenases by derivatives of 4-hydroxyquinoline-2- and 3-carboxylic acids. *J. Med. Chem.* **1972**, 15, 230-233.
14. Baker, B. R. and Bramhall, R. R.: Irreversible enzyme inhibitors. 190. Inhibition of some dehydrogenases by 1-substituted-1,4-dihydro-4-quinoline-3-carboxylic acids. *J. Med. Chem.* **1972**, 15, 233-235.

15. Baker, B. R. and Bramhall, R. R.: Irreversible enzyme inhibitors. 191. Hydrophobic bonding to some dehydrogenases by 6-, 7-, or 8-substituted-4-hydroxyquinoline-3-carboxylic acids. *J. Med. Chem.* **1972**, 15, 235-237.
16. Baker, B. R. and Bramhall, R. R.: Irreversible enzyme inhibitors. 192. Hydrophobic bonding to some dehydrogenases by 5-substituted-4-hydroxyquinoline-3-carboxylic acids. *J. Med. Chem.* **1972**, 15, 237-241.
17. Baker, B. R. and Bramhall, R. R.: Irreversible enzyme inhibitors. 194. Hydrophobic bonding to some dehydrogenases by substituted 5-phenylethyl-4-hydroxyquinoline-3-carboxylic acids. *J. Med. Chem.* **1972**, 15, 937-940.
18. Shah, K. J. and Coats, E. A.: Design, synthesis, and correlation analysis of 7-substituted-4-hydroxyquinoline-3-carboxylic acids as inhibitors of cellular respiration. *J. Med. Chem.* **1977**, 20, 1001-1006.
19. Coats, E. A., Shah, K. J., Milstein, S. R., Genther, C. S., Nene, D. M., Roesener, J., Schmidt, J., Pleiss, M., Wagner, E. and Baker, J. K.: 4-Hydroxyquinoline-3-carboxylic acids as inhibitors of cell respiration. 2. Quantitative structure-activity relationship of dehydrogenase enzyme and Ehrlich ascites tumor cell inhibitions. *J. Med. Chem.* **1982**, 25, 57-63.
20. Dove, S., Coats, E. A., Scharfenberg, P. and Franke, R.: 7-Substituted-4-hydroxyquinoline-3-carboxylic acids as inhibitors of dehydrogenase enzymes and of the respiration of Ehrlich ascites tumor cells: Multivariate analysis and quantitative structure-activity relationship for polar substituents. *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 447-451.

21. Oda, Y., Owa, T., Sato, T., Boucher, B., Daniels, S., Yamanaka, H., Shinohara, Y., Yokoi, A., Kuromitsu, J. and Nagasu, T.: Quantitative chemical proteomics for identifying candidate drug targets. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 2159-2165.
22. Knockaert, M., Wieking, K., Schmitt, S., Leost, M., Grant, K. M., Mottram, J. C., Kunick, C. and Meijer, L.: Intracellular targets of paullones. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 25493-25501.
23. Owa, T., Yoshino, H., Okauchi, T., Yoshimatsu, K., Ozawa, Y., Sugi, N. H., Nagasu, T., Koyanagi, N. and Kitoh, K.: Discovery of novel antitumor sulfonamides targeting G1 phase of the cell cycle. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 3789-3799.
24. Owa, T., Yoshino, H., Yoshimatsu, K. and Nagasu, T.: Cell cycle regulation in the G1 phase: A promising target for the development of new chemotherapeutic anticancer agents. *Curr. Med. Chem. Lett.* **2001**, 8, 1487.
25. Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Leost, M., Senderowicz, A., Lahusen, T., Kunick, C., Meijer, L. and Sausville, E. A.: Discovery and initial characterization of the paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Cancer Res.* **1999**, 59, 2566-2569.
26. Sachsenmaier, C.: Targeting protein kinases for tumor therapy. *Onkologie* **2001**, 24, 346-355.
27. Schultz, C., Link, A., Leost, M., Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Sausville, E. A., Meijer, L. and Kunick, C.: Paullones, a series of cyclin-dependent kinase inhibitors: Synthesis, evaluation of CDK1/cyclin B inhibition, and in vitro antitumor activity. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 2909-2919.

28. Kunick, C., Schultz, C., Lemcke, T., Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Jalluri, R. K., Sausville, E. A., Leost, M. and Meijer, L.: 2-Substituted paullones: CDK1/cyclin B-inhibiting property and in vitro antiproliferative activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 567-569.
29. Pies, T.: 9-Substituted paullones: Synthesis and analysis of structure-activity relationships. *Dissertation Universität Hamburg* **2003**.
30. Frame, S. and Cohen, P.: GSK-3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* **2001**, 359, 1-16.
31. Wagmann, A. S. and Nuss, J. M.: Current therapies and emerging targets for the treatment of diabetes. *Curr. Pharm. Des.* **2001**, 7, 417-450.
32. Mandelkow, E.: The tangled tale of tau. *Nature* **1999**, 402, 588-589.
33. Kunick, C., Lauenroth, K., Wieking, K., Xie, X., Schultz, C., Gussio, R., Zaharevitz, D. W., Leost, M., Meijer, L., Weber, A., Jörgensen, F. S. and Lemcke, T.: Evaluation and comparison of 3D-QSAR CoMSIA Models for CDK1, CDK5 and GSK-3 inhibition by paullones. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 22-36.
34. Leost, M., Schultz, C., Link, A., Wu, Y.-Z., Biernat, J., Mandelkow, E.-M., Bibb, J. A., Snyder, G. L., Greengard, P., Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A., Kunick, C. and Meijer, L.: Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 β and cyclin-dependent kinase 5/p25. *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 5983-5994.

35. Melani, F., Cecchi, L., Palazzino, G. and Filacchioni, G.: Synthesis of pyrazolo[4,5-*d*]- and pyrazolo[4,5-*c*]-[1]benzazepine derivatives. IV. *J. Heterocycl. Chem.* **1986**, 23, 173-176.
36. Chen, W.-Y. and Gilman, N. W.: Synthesis of 7-phenylpyrimido[5,4-*d*][1]benzazepin-2-ones. *J. Heterocycl. Chem.* **1983**, 20, 663-666.
37. Baraldi, P. G., Tabrizi, M. A., Preti, D., Bovero, A., Fruttarolo, F., Romagnoli, R., Zaid, N. A., Moorman, A. R., Varani, K. and Borea, P. A.: New 2-arylpyrazolo[4,3-*c*]quinoline derivatives as potent and selective human A₃ adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 5001-5008.
38. Forsythe, P. and Ennis, M.: Adenosine, mast cells and asthma. *Inflammation Res.* **1999**, 48, 301-307.
39. Menozzi, G., Schenone, P. and Mosti, L.: Synthesis of 5-substituted 1-aryl-1*H*-pyrazole-4-acetonitriles, 4-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazole-3-carbonitriles and pharmacologically active 1-aryl-1*H*-pyrazole-4-acetic acids. *J. Heterocycl. Chem.* **1993**, 30, 997-1002.
40. Madi, L., Ochaion, A., Rath-Wolfson, L., Bar-Yehuda, S., Erlanger, A., Ohana, G., Harish, A., Merimski, O., Barer, F. and Fishman, P.: The A₃ adenosine receptor is highly expressed in tumor *versus* normal cells: Potential target for tumor growth inhibition. *Clin. Cancer Res.* **2004**, 10, 4472-4479.
41. Melnikova, I. and Golden, J.: Targeting protein kinases. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, 3, 993-994.

42. Zimmermann, J.: Das Krebsmedikament Glivec - Produkt aus Genforschung und Wirkstoffdesign. *Nachr. Chem. Tech.* **2002**, 50, 1084-1090.
43. Fachinformation Glivec® Filmtabletten, Novartis Pharma - Stand Juli 2005. *Novartis Pharma GmbH, 90327 Nürnberg* **2005**, 1-9.
44. Sammond, D. M., Nailor, K. E., Veal, J. M., Nolte, R. T., Wang, L., Knick, V. B., Rudolph, S. K., Truesdale, A. T., Nartey, E. N., Stafford, J. A., Kumar, R. and Cheung, M.: Discovery of a novel and potent series of dianilinopyrimidineurea and urea isostere inhibitors of VEGFR-2 tyrosine kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 3519-3523.
45. Bingham, A. H., Davenport, R. J., Gowers, L., Knight, R. L., Lowe, C., Owen, D. A., Parry, D. M. and Pitt, W. R.: A novel series of potent and selective IKK2 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 409-412.
46. Hinz, B.: Therapiestrategien im Wandel der Zeit - Immunmodulatorische Therapie der rheumatoiden Arthritis. *Pharm. Unserer Zeit* **2005**, 4, 304-312.
47. Moffat, D. F. C., Allen, R. A., Rapecki, S. E., Davis, P. D., O'Connell, J., Hutchings, M. C., King, M. A., Boyce, B. A. and Perry, M. J.: 4-Thiophenoxy-*N*-(3,4,5-trialkoxyphenyl)-pyrimidine-2-amines as potent and selective inhibitors of the T-cell tyrosine kinase p56lck. *Curr. Med. Chem.* **2004**, 11, 747-753.

48. Wang, S., Wood, G., Meades, C., Griffiths, G., Midgley, C., McNae, I., McInnes, C., Anderson, S., Jackson, W., Mezna, M., Yuill, R., Walkinshaw, M. and Fisher, P. M.: Synthesis and biological activity of 2-anilino-4-(1*H*-pyrrol-3-yl)pyrimidine CDK inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 4237-4240.
49. Tavares, F. X., Boucheron, J. A., Dickerson, S. H., Griffin, R. J., Preugschat, F., Thomson, S. A., Wang, T. Y. and Zhou, H.-Q.: *N*-Phenyl-4-pyrazolo[1,5-*b*]pyridazin-3-yl-pyrimidin-2-amines as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase 3 with good cellular efficacy. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 4716-4730.
50. Pillonel, C.: Evaluation of phenylaminopyrimidines as antifungal protein kinase inhibitors. *Pest Manage. Sci.* **2005**, 61, 1069-1076.
51. Morgan, J., Haritakul, R. and Keller, P. A.: Anilinopyrimidines as novel antituberculosis agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 1755-1757.
52. Hodge, C. N., Aldrich, P. E., Wasserman, Z. R., Fernandez, C. H., Nemeth, G. A., Arvanitis, A., Cheeseman, R. S., Chorvat, R. J., Ciganek, E., Christos, T. E., Gilligan, P. J., Krenitsky, P., Scholfield, E. and Strucely, P.: Corticotropin-releasing hormone receptor antagonists: Framework design and synthesis guided by ligand conformational studies. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 819-832.
53. Cocuzza, A. J., Hobbs, F. W., Arnold, C. R., Chidester, D. R., Yarem, J. A., Culp, S., Fitzgerald, L. and Gilligan, P. J.: 4-Aryl-2-anilinopyrimidines as corticotropin-releasing hormone (CRH) antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 1057-1062.

54. Kunick, C.: Synthese [b]-kondensierter Azepindione durch Dealkoxycarbonylierung. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1991**, 324, 579-581.
55. Link, A.: Antitumoraktive Pyrido[3,2-d]-1-benzazepine. *Dissertation Universität Hamburg* **1996**.
56. Schultz, C.: Antitumoraktive [d]-anellierte [1]Benzazepin-2-one. *Dissertation Universität Hamburg* **1999**.
57. Al-Saleh, B., Abdel-Khalik, M. M., Darwich, E., Salah, O. A.-M. and Elnagdi, M. H.: Functionally substituted alkylbenzotriazoles: Reactivity of alkylbenzotriazoles toward electrophilic and nucleophilic reagents. *Heteroat. Chem.* **2002**, 13, 141-145.
58. Schenone, P., Mosti, L. and Menozzi, G.: Reaction of 2-dimethylaminomethylene-1,3-diones with dinucleophiles. I. Synthesis of 1,5-disubstituted 4-acylpyrazoles. *J. Heterocycl. Chem.* **1982**, 19, 1355-1361.
59. Olivera, R., SanMartin, R. and Domínguez, E.: A combination of tandem amine-exchange/heterocyclization and biaryl coupling reactions for the straightforward preparation of phenanthro[9,10-d]pyrazoles. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 7010-7019.
60. Olivera, R., SanMartin, R., Churruca, F. and Domínguez, E.: Revisiting the Ullmann-ether reaction: A concise and amenable synthesis of novel dibenzoxepino[4,5-d]pyrazoles by intramolecular etheration of 4,5-(O,O'-halohydroxy)arylpyrazoles. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 7215-7225.

61. Dawood, K. M.: Synthesis of spiro-pyrazole-3,3'-thiopyrano-[2,3-*d*]pyrimidines and azolo[*a*]pyrido[2',3':5,6]thiopyrano-[3,4-*d*]pyrimidines as new ring systems with antifungal and antibacterial activities. *J. Heterocycl. Chem.* **2005**, 42, 221-225.
62. Molteni, V., Hamilton, M. M., Mao, L., Crane, C. M., Termin, A. P. and Wilson, D. M.: Aqueous one-pot synthesis of pyrazoles, pyrimidines and isoxazoles promoted by microwave irradiation. *Synthesis* **2002**, 1669-1674.
63. Tonkikh, N. N., Ryzhanova, K. V., Petrova, M. V. and Strakovs, A.: 4,5-Dihydropyrazolo[3,4-*f*]quinazolines. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2003**, 39, 651-653.
64. Reidlinger, C., Dworczak, R. and Junek, H.: Cyanoacetophenone as a synthon for 1,4,5-substituted pyrazoles. *Monatsh. Chem.* **1998**, 129, 1207-1211.
65. Kunick, C.: Synthese von 7,12-Dihydro-indolo[3,2-*d*]-[1]benzazepin-6-(5*H*)-onen und 6,11-Dihydro-thieno[3',2':2,3]-azepino[4,5-*b*]indol-5(4*H*)-on. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1992**, 325, 297-299.
66. Fitzpatrick, J. T. and Hiser, R. D.: Noncatalytic Fischer indole synthesis. *J. Org. Chem.* **1957**, 22, 1703-1704.
67. Nguyen, C. H., Marchand, C., Delage, S., Sun, J.-S., Garestier, T., Hélène, C. and Bisagni, E.: Synthesis of 13*H*-benzo[6,7]- and 13*H*-benzo[4,5]indolo[3,2-*c*]quinolines: A new series of potent specific ligands for triplex DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 2501-2507.

68. Manley, P. W., Breitenstein, W., Brügggen, J., Cowan-Jacob, S. W., Furet, P., Mestan, J. and Meyer, T.: Urea derivatives of STI571 as inhibitors of Bcr-Abl and PDGFR kinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 5793-5797.
69. Kidemet, D., Elenkov, I. and Prgomet, V.: Novel synthesis of *N*-phenyl-2-aminopyrimidine derivatives under solvent-free conditions. *Synlett* **2005**, 16, 2531-2533.
70. Braunerová, G., Buchta, V., Silva, L., Kuneš, J. and Palát Jr., K.: Synthesis and in vitro antifungal activity of 4-substituted phenylguanidinium salts. *Farmaco* **2004**, 59, 443-450.
71. Brederick, H., Effenberger, F. and Hajek, M.: Synthesen in der heterocyclischen Reihe (VI.) - Darstellung von 1-Guanylpyrazol und Pyrazolyl-(1)-s-triazin. - Synthesen substituierter s-Triazine. *Chem. Ber.* **1965**, 98, 3178-3186.
72. Smith, A. F., Bergmeyer, H. U. and Bernt, E.: In: *Methods of enzymatic analysis - Volume III: Enzymes 1: Oxidoreductases, transferases*. Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J. and Graßl, M. (Hrsg.), 3. Aufl., **1987**, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 163-175.
73. *Römpf Lexikon - Naturstoffe*. Adam, G. (Bearb.), Fugmann, B. (Hrsg.), 10. Aufl., **1997**, Thieme Verlag, Stuttgart, 436.
74. Copeland, R. A.: *Enzymes - A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. 2. Aufl., **2000**, Wiley-VCH, New York, 266-304.
75. ICH harmonised tripartite guideline - Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1) - Stand November 2005. *ICH Secretariat, c/o IFPMA, 15 ch. Louis-Dunant, P. O. Box 195, 1211 Geneva 20, Switzerland* S. 1-17.

76. Kromidas, S.: *Handbuch Validierung in der Analytik*. **2000**, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 133-184.
77. Kromidas, S.: *Handbuch Validierung in der Analytik*. **2000**, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 46-76.
78. Wieking, K.: Strukturmodifikationen und Affinitätsuntersuchungen zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Paullonen. *Dissertation Universität Hamburg* **2001**.
79. Gottwald, W.: In: *Statistik für Anwender*. Gruber, U. and Klein, W. (Hrsg.), **2000**, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 43-48.
80. "Nonlinear standard curves: RIA and ELISA" were performed using GraphPad Prism version 4.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA. **2003**.
81. McGovern, S. L., Caselli, E., Grigorieff, N. and Shoichet, B. K.: A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 1712-1722.
82. McGovern, S. L., Helfand, B. T., Feng, B. and Shoichet, B. K.: A specific mechanism of nonspecific inhibition. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 4265-4272.
83. McGovern, S. L. and Shoichet, B. K.: Kinase inhibitors: Not just for kinases anymore. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 1478-1483.
84. Seidler, J., McGovern, S. L., Doman, T. N. and Shoichet, B. K.: Identification and prediction of promiscuous aggregating inhibitors among known drugs. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 4477-4486.
85. Ryan, A. J., Gray, N. M., Lowe, P. N. and Chung, C.-W.: Effect of detergent on "promiscuous" inhibitors. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 3448-3451.

86. London, J. W. and Shaw, L. M.: In: *Methods of enzymatic analysis - Volume I: Fundamentals*. Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J. and Graßl, M. (Hrsg.), 3. Aufl., **1988**, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 68-85.
87. Michal, G.: In: *Methods of enzymatic analysis - Volume I: Fundamentals*. Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J. and Graßl, M. (Hrsg.), 3. Aufl., **1988**, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 86-104.
88. Lin, J.-J. and Somero, G. N.: Thermal adaptation of cytoplasmic malate dehydrogenases of eastern pacific barracuda (*Sphyraena* spp): The role of differential isoenzyme expression. *J. Exp. Biol.* **1995**, 198, 551-560.
89. Tomita, T., Fushinobu, S., Kuzuyama, T. and Nishiyama, M.: Crystal structure of NAD-dependent malate dehydrogenase complexed with NADP(H). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 334, 613-618.
90. "Substrate-velocity curves and Lineweaver-Burk plots" were performed using GraphPad Prism version 4.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA. **2003**.
91. "Computing K_i for a competitive enzyme inhibitor" was performed using GraphPad Prism version 4.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA. **2003**.
92. Boyd, M. R.: Status of the NCI preclinical antitumor drug discovery screen. *Principles Practice Oncol.* **1989**, 3, 1-12.
93. Grever, M. R., Schepartz, S. A. and Chabner, B. A.: The National Cancer Institute: Cancer drug discovery and development program. *Semin. Oncol.* **1992**, 19, 622-638.

94. Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J. and Boyd, M.: Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, 83, 757-766.
95. Monks, A., Scudiero, D. A., Johnson, G. S., Paull, K. D. and Sausville, E. A.: The NCI anti-cancer drug screen: A smart screen to identify effectors of novel targets. *Anti-Cancer Drug Des.* **1997**, 12, 533-541.
96. Weinstein, J. N., Myers, T. G., O'Connor, P. M., Friend, S. H., Fornace Jr., A. J., Kohn, K. W., Fojo, T., Bates, S. E., Rubinstein, L. V., Anderson, N. L., Buolamwini, J. K., van Osdol, W. W., Monks, A. P., Scudiero, D. A., Sausville, E. A., Zaharevitz, D. W., Bunow, B., Viswanadhan, V. N., Johnson, G. S., Wittes, R. E. and Paull, K. D.: An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer. *Science* **1997**, 275, 343-349.
97. Robert, J.: Anticancer screening with in vitro models. *Drugs Fut.* **1997**, 22, 739-746.
98. Kunick, C., Bleeker, C., Prühs, C., Totzke, F., Schächtele, C., Kubbutat, M. H. G. and Link, A.: Matrix compare analysis discriminates subtle structural differences in a family of novel antiproliferative agents, diaryl-3-hydroxy-2,3,3a,10a-tetrahydrobenzo[*b*]cyclopenta[*e*]azepine-4,10(1*H*,5*H*)-diones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 2148-2153.

99. Hunter, T.: The croonian lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: Its role in cell growth and disease. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* **1998**, 353, 583-605.
100. Alves, F. and Hiddemann, W.: Tyrosinkinaseinhibitoren - Ein Ansatz zur Pathogeneseorientierten Tumorthherapie. *Internist* **1997**, 38, 1074-1082.
101. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S.: The protein kinase complement of the human genome. *Science* **2002**, 298, 1912-1934.
102. Montembault, E. and Prigent, C.: Aurora kinases: Therapeutic potential. *Drugs Fut.* **2005**, 30, 29-37.
103. Meraldi, P., Honda, R. and Nigg, E. A.: Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *EMBO J.* **2002**, 21, 483-492.
104. Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W.-L., Gray, J. W., Sahin, A., Brinkley, B. R. and Sen, S.: Tumor amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat. Genet.* **1998**, 20, 189-193.
105. Bolanos-Garcia, V. M.: Aurora kinases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2005**, 37, 1572-1577.
106. Jung, F. H., Pasquet, G., Brempt, C. L.-v. d., Lohmann, J.-J. M., Warin, N., Renaud, F., Germain, H., Savi, C. D., Roberts, N., Johnson, T., Dousson, C., Hill, G. B., Mortlock, A. A., Heron, N., Wilkinson, R. W., Wedge, S. R., Heaton, S. P., Odedra, R., Keen, N. J., Green, S., Brown, E., Thompson, K. and Brightwell, S.: Discovery of novel and potent

- thiazoloquinazolines as selective Aurora A and B kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 955-970.
107. Ditchfield, C., Johnson, V. L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N. and Taylor, S. S.: Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J. Cell Biol.* **2003**, 161, 267-280.
108. Blume-Jensen, P. and Hunter, T.: Oncogenic kinase signalling. *Nature* **2001**, 411, 355-365.
109. Ellis, L. M., Takahashi, Y., Liu, W. and Shaheen, R. M.: Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: Biology and therapeutic implications. *Oncologist* **2000**, 5, 11-15.
110. Peters, K. G.: Vascular endothelial growth factor and the angiopoietins : Working together to build a better blood vessel. *Circ. Res.* **1998**, 83, 342-343.
111. Siemeister, G., Schirner, M., Weindel, K., Reusch, P., Menrad, A., Marme, D. and Martiny-Baron, G.: Two independent mechanisms essential for tumor angiogenesis: Inhibition of human melanoma xenograft growth by interfering with either the vascular endothelial growth factor receptor pathway or the Tie-2 pathway. *Cancer Res.* **1999**, 59, 3185-3191.
112. Meyer, S., Hafner, C. and Vogt, T.: Die Rolle der Rezeptortyrosinkinasen in der Angiogenese - Funktionen und therapeutische Implikationen. *Hautarzt* **2002**, 53, 629-643.
113. Daub, H., Specht, K. and Ullrich, A.: Strategies to overcome resistance to targeted protein kinase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, 3, 1001-1010.

114. Fong, T. A. T., Shawver, L. K., Sun, L., Tang, C., App, H., Powell, T. J., Kim, Y. H., Schreck, R., Wang, X., Risau, W., Ullrich, A., Hirth, K. P. and McMahon, G.: SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res.* **1999**, 59, 99-106.
115. Laird, A. D., Vajkoczy, P., Shawver, L. K., Thurnher, A., Liang, C., Mohammadi, M., Schlessinger, J., Ullrich, A., Hubbard, S. R., Blake, R. A., Fong, T. A. T., Strawn, L. M., Sun, L., Tang, C., Hawtin, R., Tang, F., Shenoy, N., Hirth, K. P., McMahon, G. and Cherrington, J. M.: SU6668 is a potent antiangiogenic and antitumor agent that induces regression of established tumors. *Cancer Res.* **2000**, 60, 4152-4160.
116. Motzer, R. J., Michaelson, M. D., Redman, B. G., Hudes, G. R., Wilding, G., Figlin, R. A., Ginsberg, M. S., Kim, S. T., Baum, C. M., DePrimo, S. E., Li, J. Z., Bello, C. L., Theuer, C. P., George, D. J. and Rini, B. I.: Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **2006**, 24, 16-24.
117. Drevs, J., Konerding, M. A., Wolloscheck, T., Wedge, S. R., Ryan, A. J., Ogilvie, D. J. and Esser, N.: The VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, ZD6474, inhibits angiogenesis and affects microvascular architecture within an orthotopically implanted renal cell carcinoma. *Angiogenesis* **2004**, 7, 347-354.

118. LaMontagne, K.: Antiangiogenesis: New frontiers in therapeutic development. *Angiogenesis* **2005**, 8, 285-287.
119. Tuccillo, C., Romano, M., Troiani, T., Martinelli, E., Morgillo, F., De Vita, F., Bianco, R., Fontanini, G., Bianco, R. A., Tortora, G. and Ciardiello, F.: Antitumor activity of ZD6474, a vascular endothelial growth factor-2 and epidermal growth factor receptor small molecule tyrosine kinase inhibitor, in combination with SC-236, a cyclooxygenase-2 inhibitor. *Clin. Cancer Res.* **2005**, 11, 1268-1276.
120. Wood, J. M., Bold, G., Buchdunger, E., Cozens, R., Ferrari, S., Frei, J., Hofmann, F., Mestan, J., Mett, H., O'Reilly, T., Persohn, E., Rosel, J., Schnell, C., Stover, D., Theuer, A., Towbin, H., Wenger, F., Woods-Cook, K., Menrad, A., Siemeister, G., Schirner, M., Thierauch, K.-H., Schneider, M. R., Dreys, J., Martiny-Baron, G., Totzke, F. and Marme, D.: PTK787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *Cancer Res.* **2000**, 60, 2178-2189.
121. Hess-Stumpp, H., Haberey, M. and Thierauch, K.-H.: PTK 787/ZK 222584, a tyrosine kinase inhibitor of all known VEGF receptors, represses tumor growth with high efficacy. *ChemBioChem* **2005**, 6, 550-557.
122. Herbst, R. S. and Sandler, A. B.: Non-small cell lung cancer and antiangiogenic therapy: What can be expected of Bevacizumab? *Oncologist* **2004**, 9 (suppl. 1), 19-26.

123. Jayson, G., Armand, J.-P. and Berdel, W. E.: Angiogenese-Hemmung durch Proteine, Peptide und "small molecules": Klinischer Einsatz. *Onkologie* **2005**, 28, 29-34.
124. Thomas, S. M. and Brugge, J. S.: Cellular functions regulated by SRC family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1997**, 13, 513-609.
125. Matsumoto, T., Jiang, J., Kiguchi, K., Ruffino, L., Carbajal, S., Beltran, L., Bol, D. K., Rosenberg, M. P. and DiGiovanni, J.: Targeted expression of c-Src in epidermal basal cells leads to enhanced skin tumor promotion, malignant progression, and metastasis. *Cancer Res.* **2003**, 63, 4819-4828.
126. Wiener, J. R., Nakano, K., Kruzelock, R. P., Bucana, C. D., Bast Jr., R. C. and Gallick, G. E.: Decreased SRC tyrosine kinase activity inhibits malignant human ovarian cancer tumor growth in a nude mouse model. *Clin. Cancer Res.* **1999**, 5, 2164-2170.
127. Myoui, A., Nishimura, R., Williams, P. J., Hiraga, T., Tamura, D., Michigami, T., Mundy, G. R. and Yoneda, T.: C-Src tyrosine kinase activity is associated with tumor colonization in bone and lung in an animal model of human breast cancer metastasis. *Cancer Res.* **2003**, 63, 5028-5033.
128. Waltenberger, J., Uecker, A., Kroll, J., Frank, H., Mayr, U., Bjorge, J. D., Fujita, D., Gazit, A., Hombach, V., Levitzki, A. and Bohmer, F.-D.: A dual inhibitor of platelet-derived growth factor β -receptor and Src kinase activity potently interferes with motogenic and mitogenic responses to PDGF in vascular smooth muscle cells : A novel candidate for prevention of vascular remodeling. *Circ. Res.* **1999**, 85, 12-22.

129. Missbach, M., Jeschke, M., Feyen, J., Müller, K., Glatt, M., Green, J. and Šuša, M.: A novel inhibitor of the tyrosine kinase Src suppresses phosphorylation of its major cellular substrates and reduces bone resorption in vitro and in rodent models in vivo. *Bone* **1999**, 24, 437-449.
130. Klutchko, S. R., Hamby, J. M., Boschelli, D. H., Wu, Z., Kraker, A. J., Amar, A. M., Hartl, B. G., Shen, C., Klohs, W. D., Steinkampf, R. W., Driscoll, D. L., Nelson, J. M., Elliott, W. L., Roberts, B. J., Stoner, C. L., Vincent, P. W., Dykes, D. J., Panek, R. L., Lu, G. H., Major, T. C., Dahring, T. K., Hallak, H., Bradford, L. A., Showalter, H. D. H. and Doherty, A. M.: 2-Substituted aminopyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-ones. Structure-activity relationships against selected tyrosine kinases and in vitro and in vivo anticancer activity. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 3276-3292.
131. Šuša, M., Missbach, M. and Green, J.: Src inhibitors: Drugs for the treatment of osteoporosis, cancer or both? *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, 21, 489-495.
132. Schlaepfer, D. D., Mitra, S. K. and Ilic, D.: Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1692, 77-102.
133. Braren, R., Hu, H., Kim, Y. H., Beggs, H. E., Reichardt, L. F. and Wang, R.: Endothelial FAK is essential for vascular network stability, cell survival, and lamellipodial formation. *J. Cell Biol.* **2006**, 172, 151-162.

134. Sawai, H., Okada, Y., Funahashi, H., Matsuo, Y., Takahashi, H., Takeyama, H. and Manabe, T.: Activation of focal adhesion kinase enhances the adhesion and invasion of pancreatic cancer cells via extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway activation. *Mol. Cancer Res.* **2005**, 4, 1-12.
135. Choi, H.-S., Wang, Z., Richmond, W., He, X., Yang, K., Jiang, T., Karanewsky, D., Gu, X.-J., Zhou, V. and Liu, Y.: Design and synthesis of 7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidines as focal adhesion kinase inhibitors. Part 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 2689-2692.
136. Joshi, E., Chordia, M. D., Macdonald, T. L., Linden, J. and Olsson, R.: Regioselective oxidation of 2-amino-3-aryl-4,5-dialkylthiophenes by DMSO. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 929-933.
137. Ponce, M. A. and Erra-Balsells, R.: Synthesis and isolation of nitro- β -carboline obtained by oxidation of commercial β -carboline alkaloids. *J. Heterocycl. Chem.* **2001**, 38, 1071-1082.
138. Erra-Balsells, R. and Frasca, A. R.: Photochemical reaction of carbazole and some derivatives in dichloromethane. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 5363-5366.
139. Crumrine, D. S., Brodbeck, C. M., Dombrowski, P. H., Haberkamp, T. J., Kekstas, R. J., Nabor, P., Nomura, G. S., Padleckas, H. A., Suther, D. J. and Yonan, J. P.: Photocleavage of diarylnitrosamines in neutral media. *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 4246-4249.

140. Armarego, W. L. F. and Chai, C. L. L.: *Purification of Laboratory Chemicals*. 5. Aufl., **2003**, MPG Books, Bodmin, Cornwall, 6-52.
141. Moriconi, E. J. and Maniscalco, I. A.: π -Equivalent heterocyclic congeners of tropone. Azatropones. *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 208-215.
142. Balasubramaniyan, V. and Argade, N.: Reactions of cyclic anhydrides: Part XIII - Facile synthesis of 1,2,3,4-tetrahydro-10*H*-pyridazino[6,1-*b*]quinazoline-2,10-diones. *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **1988**, 27, 906-908.
143. Heesing, A. and Schmaladt, W.: Zum Substituenteneinfluß der Guanidino- und der Guanidiniumgruppe, Teil I - Der Effekt auf die ^{19}F -NMR-Spektren von Fluorbenzolen und auf die aromatische Substitution. *Chem. Ber.* **1978**, 111, 320-334.
144. Gray, G. D. and Wickstrom, E.: Evaluation of anchorage-independent proliferation in tumorigenic cells using the redox dye alamarBlueTM. *BioTechniques* **1996**, 21, 780-782.
145. Zhang, J. H., Chung, T. D. and Oldenburg, K. R.: A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.* **1999**, 4, 67-73.

Anhang zu Kapitel 9

Liste wichtiger Internet-Seiten:

- Station Biologique de Roscoff (CNRS, Bretagne, Frankreich): www.sb-roscoff.fr
- Firma ProQinase (Freiburg): www.proqinase.com
- National Cancer Institute (Bethesda, Maryland, USA): www.cancer.gov
- ICH Sekretariat (Genf, Schweiz): www.ich.org
- GraphPad Software (San Diego, Kalifornien, USA): www.graphpad.com
- UCSF Chimera (University of California, USA): www.cgl.ucsf.edu/chimera
- ArgusLab-Planaria Software LLC (Seattle, WA, USA): www.arguslab.com
- Advanced Chemistry Development Inc. (Toronto, Ontario, Kanada): www.acdlabs.com

Danksagung

Für die Unterstützung und die Ermöglichung eines Forschungsaufenthaltes an der Station Biologique de Roscoff (CNRS, Bretagne, Frankreich) danke ich *Herrn Prof. Dr. L. Meijer* herzlich. Seinem Arbeitskreis, insbesondere *Frau S. Schmitt, Frau M. Leost* und *Herrn O. Lozach*, danke ich für die schöne Zusammenarbeit und die stete Gastfreundschaft.

Für die Durchführung der Proteinkinase-Testungen danke ich *Herrn Dr. M. Kubbutat, Herrn Dr. F. Totzke, Herrn Dr. C. Schächtele, Frau Dr. U. Zirrgiebel, Herrn Dr. J. Ehlert* und der Firma ProQinase (Freiburg) sowie dem National Cancer Institute (Bethesda, Maryland, USA) und seinen Mitarbeitern für die Bestimmung der in vitro Antitumoraktivität an Tumorzelllinien.

Meinen herzlichen Dank für die Erstellung der Molecular Modeling-Abbildungen möchte ich *Herrn Dr. L. Preu* aussprechen.

Ich danke den Mitarbeiterinnen der Analytischen Abteilung des Institutes für Pharmazeutische Chemie für die Anfertigung der FT-IR-Spektren, die Durchführung der Elementaranalysen und die Probenvorbereitung für die NMR-Experimente. Für die Aufnahme der NMR-Spektren danke ich *Herrn Prof. Dr. L. Ernst, Frau D. Deuse* und *Frau P. Holba-Schulz* (NMR-Laboratorien der Chemischen Institute). Den *Herren Dres. U. Papke* und *T. Beuerle* sowie *Frau D. Döring* danke ich für die Aufnahme der Massenspektren. *Herrn Dr. U. Papke* gilt darüber hinaus mein Dank

für die Hilfestellung bei der Interpretation. Für die Anfertigung der Röntgenkristallstrukturanalysen danke ich *Herrn Prof. Dr. P. G. Jones*.

Sehr dankbar bin ich meinen wissenschaftlichen Hilfskräften Frau A. *Penkhues* und Frau J. *Krämer* für ihre unterstützende Arbeit, vor allem bei den Malatdehydrogenase-Testungen.

Den Mitarbeitern des Institutes für Pharmazie der Universität Hamburg danke ich für die angenehme Zusammenarbeit. Für seine Diskussionsbereitschaft und seinen fachlichen Rat möchte ich mich bei *Herrn Dr. Th. Lemcke* bedanken. Zudem gilt mein Dank für die angenehme und erfolgreiche Zusammenarbeit den Mitgliedern des Arbeitskreises *Frau Dr. T. Pies*, *Frau Dr. J. Roever* (geb. *Möllenbeck*) und *Herrn C. Prühs*.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig für das freundliche Arbeitsklima und die schöne Zeit in Braunschweig bedanken. Mein besonderer Dank gilt dem Arbeitskreis mit *Herrn C. Prühs*, *Frau U. Dunkel*, *Frau B. Berger*, *Herrn H. Stukenbrock*, *Frau Chr. Reichwald*, *Frau A.-M. Egert*, *Frau A. Becker* und *Frau W. Brandt*.

Für das Lesen der Korrekturen danke ich *Frau B. Berger*, *Frau Chr. Reichwald*, *Frau A. Becker* und *Herrn Dr. Chr. Enge*.

Frau B. Berger möchte ich außerdem für die gemeinsame Erschließung der Arylguanidine und über die fachlichen Aspekte hinaus für ihre großzügigie Hilfsbereitschaft meinen Dank aussprechen.

Zuletzt danke ich sehr herzlich *Herrn G. Kohfeld, Frau R. Kohfeld, Herrn Dr. J. Ohnesorge, Herrn B. Güth* und meinen Freunden für ihre uneingeschränkte Unterstützung.

Lebenslauf

Name:	Simone Kohfeld
Geburtsdatum/-ort:	22. März 1978 in Reinbek
08/1988-07/1991	Gymnasium Bramfeld, Hamburg
08/1991-06/1997	Gymnasium Bornbrook, Hamburg
06/1997	Allgemeine deutsche Hochschulreife
10/1997-10/2001	Studium der Pharmazie an der Universität Hamburg
11/2001-04/2002	erster Abschnitt der praktischen Ausbildung bei der Asche AG in der Abteilung für Qualitätskontrolle in Hamburg
05/2002-10/2002	zweiter Abschnitt der praktischen Ausbildung in der Apotheke Zur Alten Post (Inh.: J. Mewes) in Hamburg
12/2002	Approbation als Apothekerin
11/2002-12/2003	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg
seit 01/2004	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig